



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Departamento de Química

Tesis de Doctor en Química

"Exclusión de agua y unión de proteínas: Implicaciones en estudios de la función biológica, diseño de drogas, bioingeniería y diseño de materiales"

Lic. Joan Manuel Montes de Oca

Bahía Blanca, Argentina

2017

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el área IV (Fisicoquímica), Departamento de Química, dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 8 de mayo de 2012 y el 13 de noviembre de 2017, bajo la dirección del Doctor Gustavo A. Appignanesi, Profesor Titular del Dpto. de Química de la UNS e investigador principal del CONICET y la co-dirección del Doctor J. Ariel Rodríguez Fris, Asistente de docencia con dedicación exclusiva del Dpto. de Química de la UNS e investigador adjunto del CONICET.

[Firma del Alumno]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Dedico esta tesis a todos los que contribuyeron a hacerla posible pero que jamás van a leerla, especialmente a aquellos que no lo saben.

Esta tesis es el producto final de la aplicación de políticas de educación y ciencia públicas en el país. Con esta dedicatoria pretendo devolver simbólicamente el apoyo a esas políticas y fomentar la discusión sobre los alcances del término "público" y "universal" en educación y ciencia. Este trabajo está dedicado especialmente a aquellos sectores de la sociedad que sostienen estas políticas pero que no pueden acceder a todos sus beneficios.

Si bien no forma parte de mi campo de experticia, creo que la única manera de explotar la completa potencialidad de las políticas públicas es a través de una visión integral de país más inclusiva, más justa y más solidaria. Asumo mi responsabilidad primero como egresado del más alto grado del sistema académico nacional, pero sobre todo como integrante del sistema educativo y beneficiario de todas las políticas públicas a su servicio; de defender y promover esos valores en el ejercicio de mi profesión.

Agradecimientos

Agradezco a mis afectos, a las personas que me acompañan siempre, pero ese es un agradecimiento privado.

En cambio, quiero agradecer públicamente a mi director Gustavo Appignanesi y a todo el grupo de personas con el que tuve el privilegio de trabajar durante el desarrollo de mi doctorado. Es importante el reconocimiento público porque ellos no son mis destinatarios, sino todo aquel que alguna vez lea este trabajo.

Mi agradecimiento a Gustavo es infinito y es eterno (si es que no son la misma cosa), lo que quiero decir es que no es mensurable porque es un sentimiento. Gustavo tiene la capacidad de devolvernos a todos los que trabajamos con él, una imagen mejorada y cierta de nosotros mismos. La virtud de Gustavo como líder y maestro radica en su enorme generosidad, en su capacidad de nunca hacer valer su autoridad objetiva y, en cambio, ser el primero en respaldar nuestras ideas. En todo caso, su jerarquía se pone en juego solo hacia afuera, amparando nuestras ideas bajo el prestigio de su propio nombre. Para terminar solo quiero expresarle todo mi cariño y mi admiración por haberme enseñado mucho más de lo que contiene esta tesis y por haberme hecho sentir que mi contribución en el grupo también era importante.

Como dije, también quiero aprovechar a agradecer a todos los integrantes del grupo, excelentes compañeros de trabajo y aún mejores personas. Particularmente quiero agradecer a Ariel Rodríguez Fris por ayudarme, con toda la humildad del mundo, a dar mis primeros pasos en este hermoso universo que es la investigación científica.

Por último agradezco a CONICET y a la UNS por darme lugar a hacer de mi vocación mi modo de vida.

Resumen

El estudio de las interacciones no covalentes nace prácticamente al mismo tiempo que se comienza a desarrollar la fisicoquímica moderna; de hecho, las leyes que utilizamos para describirlas aún hoy en día fueron establecidas por Van der Waals a finales del mil ochocientos. Sin embargo, en la base de este trabajo subyace la hipótesis de que todavía queda mucho por entender, particularmente en lo que refiere a interacciones electrostáticas en medios acuosos.

La realidad es que la ciencia moderna avanza rápidamente hacia el tratamiento de problemáticas cada vez más complejas (por ejemplo, el estudio de sistemas biológicos, materiales de dimensiones nanométricas, etc.) con más y mejores herramientas metodológicas. Hoy en día contamos, por ejemplo, con la capacidad de estudiar sistemas químicos con detalle atómico. Lo que proponemos en este trabajo es, inicialmente, la reinterpretación de esas primeras leyes fundamentales, a la luz de los nuevos descubrimientos y luego, la implementación de ese nuevo formalismo para el abordaje de las problemáticas complejas antes mencionadas.

En definitiva, planteamos una mirada integradora de los interrogantes científicos modernos en este campo, conceptualmente elaborada a partir de los principios físicos básicos que ordenan la naturaleza, como alternativa a una serie de normas de origen más bien fenomenológico, frecuentemente utilizadas en el presente para su interpretación. Este enfoque fenomenológico, no solo ensombrece la construcción del conocimiento universal, sino que, incluso, puede llegar a significar un desperdicio de recursos, dada la inherente limitación en la aplicabilidad de sus conclusiones. Para ilustrar esta situación basta mencionar que actualmente se ha invertido más esfuerzo de la comunidad científica en mejorar los métodos basados en el escrutinio de grandes bases de datos para estudiar, por ejemplo, actividad de fármacos, predicción de estructuras proteicas, etc., que en generar conceptos que permitan un acercamiento inteligente a estas cuestiones.

Tal vez la primera pregunta que operó como impulso de todo lo que en este trabajo se expone es, simplemente, ¿por qué son relevantes las interacciones electrostáticas en un medio con constante dieléctrica tan alta como el agua?

Es una pregunta relativamente simple, ciertamente no del todo original, pero sepultada sin una respuesta concluyente en los anales históricos de la ciencia.

Para responder a esta pregunta y a varias de sus derivaciones de mayor complejidad nos adentramos en un camino conceptual que comienza en los estudios de las características de estructuración local y dinámica del agua pura, luego explora las diferencias de comportamiento del agua en entornos superficiales y nanoconfinados, identificando los factores del entorno fisicoquímico que gobiernan las propiedades locales del solvente. Más adelante estudiamos interacciones electrostáticas de sistemas modelos en agua, alternando sistemáticamente las condiciones del entorno químico, según lo aprendido con antelación y, finalmente, sometimos a prueba todos estos criterios en sistemas biológicos complejos en solución acuosa.

Los resultados aquí obtenidos contribuyen a la desambiguación de una dialéctica establecida en torno al concepto de hidrofobicidad. Entendiendo que, en definitiva, la hidrofobicidad de una superficie se define en función de su efecto sobre el solvente. Asimismo, señalamos que este efecto se encuentra cifrado en una variedad de características de la superficie, tales como la densidad superficial de interacciones de Van der Waals, la curvatura local, y no solo la identidad química de la superficie (su polaridad). Llegamos a la conclusión, también, de que, una vez entendido el efecto que tiene una superficie hidrofóbica sobre el agua en su vecindad, se puede afirmar que un entorno hidrofóbico optimiza las interacciones de carga en agua.

Finalmente, demostramos que la exclusiva consideración del efecto del solvente sobre interacciones no covalentes (particularmente puentes de hidrógeno intramoleculares), sin incluir de manera explícita las interacciones tradicionales, permite predecir con éxito tanto la unión de proteínas a sustratos, como los mecanismos estructurales que gobiernan la regulación alostérica.

Abstract

The study of non-covalent interactions begins practically at the same time as the development of modern physicochemistry; in fact, the laws that we use to describe them even today were established by Van der Waals at the end of the eighteen hundreds. However, at the basis of this work lies the hypothesis that much remains to be understood in this field, particularly in regard to electrostatic interactions in aqueous media.

The reality is that modern science is moving rapidly towards the treatment of increasingly complex problems (for example, the study of biological systems, materials of nanometric dimensions, etc.) with more and better methodological tools. Today we have, for example, the ability to study chemical systems with atomic detail. What we propose in this paper is, initially, the reinterpretation of these first fundamental laws, in light of the new discoveries and then, the implementation of this new formalism to address the complex problems mentioned above.

In short, we propose an integrating view of the modern scientific questions in this field, conceptually elaborated from the basic physical principles that order nature, as an alternative to a series of rather phenomenological norms, frequently used at the present for its interpretation. This phenomenological approach not only overshadows the construction of universal knowledge, but can even mean a waste of resources, given the inherent limitation in the applicability of its conclusions. To illustrate this situation it is enough to mention that currently more effort has been invested by the scientific community to improve the methods based on the scrutiny of large databases to study, for example, drug activity, prediction of protein structures, etc., that in generate concepts that allow an intelligent approach to these issues.

Perhaps the first question that worked as an impulse for everything that is exposed in this paper is, simply, why are electrostatic interactions in a medium with dielectric constant as high as water relevant?

It is a relatively simple question, certainly not entirely original, but buried without a conclusive answer in the historical annals of science.

To answer this question and several of its more complex derivations, we enter a conceptual path that begins with studies of the characteristics of local and dynamic structuring of pure water, then explores the differences in water behavior in surface and nanoconfined environments, identifying the physicochemical environment factors that govern the local properties of the solvent. Later we study electrostatic interactions of model systems in water, systematically alternating the conditions of the chemical environment, as learned in advance and, finally, we tested all these criteria in complex biological systems in aqueous solution.

The results obtained here contribute to the disambiguation of a dialectic established around the concept of hydrophobicity. Understanding that, in short, the hydrophobicity of a surface is defined in terms of its effect on the solvent. Likewise, we point out that this effect is found in a variety of surface characteristics, such as the surface density of Van der Waals interactions, the local curvature, and not only the chemical identity of the surface (its polarity). We also conclude that, once we understand the effect that a hydrophobic surface has on water in its vicinity, we can affirm that a hydrophobic environment optimizes the electrostatic interactions in water.

Finally, we demonstrate that the exclusive consideration of the effect of the solvent on non-covalent interactions (particularly intramolecular hydrogen bonds), without explicitly including traditional interactions, allows to successfully predict both the binding of proteins to substrates and the structural mechanisms that govern the allosteric regulation.

Publicaciones suscitadas por la tesis:

1. Montes de Oca, J., Rodriguez Fris, A., Appignanesi, G. & Fernández, A. Productive induced metastability in allosteric modulation of kinase function. *FEBS J.* 281, 3079–3091 (2014).
2. Alarcon, L. M., Montes de Oca, J. M., Accordino, S. R., Rodriguez Fris, J. A. & Appignanesi, G. A. Hydrophobicity and geometry: Water at curved graphitic-like surfaces and within model pores in self-assembled monolayers. *Fluid Phase Equilib.* 362, 81–86 (2014).
3. Accordino, S. R., Montes De Oca, J. M., Rodriguez Fris, J. A. & Appignanesi, G. A. Hydrophilic behavior of graphene and graphene-based materials. *J. Chem. Phys.* (2015).
4. Alarcón, L. M. Rodriguez Fris J.A, Morini M.A., Sierra M.B, Accordino S.A., Montes de Oca J.M, Pedroni V.I, & Appignanesi G.A. Hydration and nanoconfined water: Insights from computer simulations. *Subcell. Biochem.* (2015).
5. Montes De Oca, J. M., Rodriguez Fris, J. A., Accordino, S. R., Malaspina, D. C. & Appignanesi, G. A. *THE EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL E* Structure and dynamics of high-and low-density water molecules in the liquid and supercooled regimes. *Eur. Phys. J. E* (2016).
6. Montes de Oca, J. M., Menéndez, C. A., Accordino, S. R., Malaspina, D. C. & Appignanesi, G. A. Studies on electrostatic interactions within model nanoconfined aqueous environments of different chemical nature. *Eur. Phys. J. E* 40, 78 (2017).

Índice de contenido

Prefacio	2
Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	7
Índice de contenido	10
Capítulo 1	13
<i>Introducción</i>	13
<i>Marco teórico y estado del arte.</i>	18
El agua: generalidades, estructura y modelado.	18
Agua en superficies y entornos nanoconfinados.	21
Naturaleza de las interacciones no covalentes, la importancia del medio:	24
Interacciones en contexto: estudio sobre proteínas	29
<i>Síntesis conceptual</i>	31
Capítulo 2	33
<i>Estructura y dinámica de agua pura líquida y en regímenes sobreenfriados</i>	33
<i>Introducción</i>	33
Método de evaluación estructural (LSI)	37
Función de distribución radial (G(r))	38
Evaluación de dinámicas de relajación	39
<i>Metodología</i>	40
<i>Resultados</i>	40
Resultados de LSI en estructuras inherentes	40
Detalles del entorno local para moléculas de alta y baja estructuración	42
Dependencia del índice de estructura local con la temperatura	44
Dependencia de la fracción de moléculas estructuradas con la temperatura.	45
Relación entre la dinámica de relajación vítrea y el pasaje de estructuras locales con alto y bajo LSI	46
<i>Conclusiones del capítulo</i>	47

Capítulo 3	48
<i>Agua nano confinada y superficial</i>	48
<i>Introducción</i>	48
¿Qué es la hidrofobicidad?	49
<i>Hidrofobicidad y geometría: agua en superficies con curvatura y poros.</i> ⁸¹	52
<i>Metodología</i>	53
<i>Resultados</i>	54
Orientación del agua superficial	54
Hidrofobicidad de superficies de curvatura cóncava	57
<i>Comportamiento hidrofílico en grafeno y superficies gráficas</i> ⁸⁰	59
<i>Metodología</i>	61
<i>Resultados</i>	63
Autoensamblado en medio acuoso	63
Potenciales de fuerza media (PMF)	64
Estudio de fluctuaciones de densidad	66
Perfiles de densidad de agua	67
<i>Conclusiones del capítulo</i>	68
Capítulo 4	70
<i>Interacciones electrostáticas en agua</i>	70
<i>Introducción</i>	70
<i>Metodología</i>	75
Descripción de los sistemas	75
<i>Resultados</i>	76
Potenciales de fuerza media para el ensamble de placas cargadas	76
Perfiles de energía en placas neutras.	80
Comparación directa entre sistemas neutros y cargados	83
Estudio de placas con cargas en distinta localización	84
Análisis sobre placas aisladas	85
Teoría de solvatación inhomogénea (GIST)	86
<i>Conclusiones del capítulo</i>	87
Capítulo 5	89
<i>Interacciones electrostáticas en medios complejos</i>	89

<i>Introducción.</i>	89
¿Por qué es importante la estructura tridimensional de las proteínas?	90
Defectos estructurales en proteínas	93
Anatomía de un "Hot Spot" (o sitio relevante de unión de proteínas)	95
Modulación de la actividad proteica por medio de efectores externos (regulación alostérica enzimática)	96
<i>Regulación alostérica, binding y el concepto de metaestabilidad productiva inducida por la unión³¹.</i>	98
<i>Metodología</i>	99
<i>Resultados</i>	101
Estudio sobre quinasas de mecanismo alostérico DFG-in, DFG-out:	101
Análisis sobre quinasas con bolsillo hidrofóbico como sitio de regulación alostérica:	107
Análisis de eventos PIM como método para la reingeniería de drogas:	113
<i>Conclusiones y discusión sobre el estudio de eventos PIM en proteínas quinasas.</i>	117
<i>Aspectos dinámicos del mecanismo de unión de proteínas.</i>	120
Propensión dinámica de puentes de hidrógeno	120
Relación entre puentes de hidrógeno camaleónicos y binding de proteínas	124
<i>Diferencias y similitudes entre los conceptos de PIM y la propensión dinámica de puentes de hidrógeno camaleónicos</i>	125
<i>Conclusiones del capítulo</i>	128
Capítulo 6	130
<i>Conclusiones generales</i>	130
Bibliografía	135

Capítulo 1

Introducción

A lo largo de este trabajo intentaremos abordar, de una manera paulatina y sistemática, los complejos mecanismos que gobiernan las fuerzas no covalentes, tanto inter como intra moleculares en medio acuoso. Particularmente nos focalizaremos en aquellas interacciones involucradas en procesos tales como el autoensamblado molecular, la interacción y reconocimiento molecular, el ordenamiento estructural de proteínas, etc. Resulta relevante para la comprensión de la forma en que se organiza esta tesis, mencionar que se trata de una tarea de deconstrucción de estos mecanismos y de una posterior reorganización de sus componentes en orden creciente de complejidad. El entendimiento de estos mecanismos de modulación de las interacciones no covalentes en agua es de vital relevancia, principalmente en campos como la biotecnología, la medicina, la ciencia de materiales, etc.

Las pretensiones originales de este proyecto consistían en revelar el papel que juega el agua en procesos biológicos relevantes, tales como el plegamiento y binding de proteínas, el funcionamiento de los sitios de unión, regulación alostérica, etc. Sin embargo, una observación un poco más profunda sobre estas problemáticas, demostró que existe una dimensión casi dialéctica en la definición del caso de estudio. Esta naturaleza dialéctica del problema se pone de manifiesto inmediatamente al considerar que el efecto que tiene el agua sobre las interacciones no covalentes depende, en gran medida, de la organización del propio solvente a su alrededor. Como veremos más adelante, el comportamiento del agua se ve a su vez, fuertemente modificado según el entorno en el que se encuentre confinado.

Según lo antes expuesto, la única solución posible a un problema dialéctico de este tipo es el establecimiento de un principio denominado *síntesis* para el cual es posible, incluso, desarrollar nuevos conceptos que faciliten la

desambiguación y corten el círculo infinito de revisión de la *tesis* una vez descubierta su *antítesis* (ver dialéctica hegeliana^{1,2}).

El agua es el solvente por excelencia en la tierra. Su simpleza molecular, su abundancia y su ubicuidad le confieren un interés particular desde los comienzos de la investigación científica. Sin embargo, aún en estos días, muchas de sus cualidades permanecen incomprendidas. Pese a su simpleza molecular, es su capacidad de organización colectiva lo que le confiere un abanico interminable de comportamientos. De hecho, es su pequeño tamaño, el alto momento dipolar y la capacidad de formar puentes de hidrógeno lo que le otorgan las variables necesarias para construir esa gama de propiedades, muchas veces contraintuitivas, que constituyen la dificultad de su estudio.

Para ilustrar el grado de incompreensión de las propiedades fisicoquímicas del agua es suficiente mencionar que, aún hoy, hay varios interrogantes sobre el comportamiento y la estructura del agua pura líquida en distintas condiciones de presión y temperatura. Si a eso le agregamos las incertidumbres de considerar efectos tales como el confinamiento, interacción en superficies, efectos de *crowding molecular*, etc., es claro que todavía queda un largo camino por recorrer en el ejercicio de su estudio.

De hecho, uno de los problemas que se encontró durante el desarrollo de este trabajo es, justamente, la dificultad de establecer un criterio claro de lo que significa hablar del agua de hidratación. Nos vamos a encontrar muchas veces, en los sucesivos capítulos, hablando de conceptos tales como *hidrofobicidad* e *hidrofilicidad*, que por convención, son categorías para clasificar sistemas fisicoquímicos en función del efecto que tienen sobre el agua que los rodea. No obstante, poco o nada existe aún en la literatura que distinga inequívocamente el agua confinada, según su comportamiento en estas condiciones.

Como analizaremos más profundamente a lo largo de las introducciones teóricas de los sucesivos capítulos, el agua confinada en escala nanométrica presenta propiedades que distan mucho de aquellas observables en contextos de agua pura “masiva” o *bulk*. De hecho, en estas condiciones es un absurdo hablar de propiedades continuas o incluso isotrópicas del agua. Es por este motivo que, en el contexto de este trabajo, es preciso alternar entre un enfoque centrado en las características del agua y otro abocado a las propiedades

fisicoquímicas de los sistemas aisladamente, para, finalmente, encontrar los puntos de unión entre ambos, que satisfagan una teoría más general.

Antes de continuar con la descripción del trabajo que se llevó adelante durante el proyecto de tesis, cabe aclarar que la metodología utilizada para el abordaje de todos los temas que aquí se mencionan es la experimentación computacional o muchas veces mal llama “investigación teórica”.

El método de dinámica molecular (MD) consiste en la simulación computacional de sistemas fisicoquímicos con detalle atómico. La dinámica molecular clásica se basa en la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton para cada partícula del sistema, interactuando a partir de campos de fuerza específicamente diseñados (aproximando de distintas maneras los efectos cuánticos). Entre las ventajas principales de la dinámica molecular se encuentra su capacidad por arrojar como resultado trayectorias con detalle atómico y, que siempre que se cumpla la hipótesis ergódica, estas pueden ser utilizadas para determinar las propiedades termodinámicas del sistema. Por otro lado, por supuesto, este método tiene sus dificultades: en principio la aproximación de las propiedades físicas reales mediante modelos sencillos de campos de fuerza, en general, se orientan a la reproducción de algunas propiedades de interés (y por lo tanto su aplicabilidad es limitada); además, dada la inmensa cantidad de partículas de los sistemas usualmente estudiados, la resolución analítica de todas las ecuaciones de movimiento es impracticable, por lo que se utilizan métodos numéricos de integración que también introducen errores; finalmente, aún con los métodos anteriores para la simplificación del problema, los algoritmos de dinámica molecular son computacionalmente costosos, por lo que el tamaño de los sistemas y el tiempo de simulación limitan su aplicación. Sin embargo, el modelado computacional de sistemas fisicoquímicos es una herramienta cada vez más refinada; por un lado, por el increíble incremento de las capacidades de cómputo disponibles hoy en día, pero además, por el desarrollo continuo de mejoras de software de las principales suits disponibles. Actualmente el estudio de sistemas de dimensiones nanométricas atraviesa un periodo muy interesantes, caracterizado por la confluencia de técnicas experimentales (antes de alcance solo macroscópico) y computacionales, que cada vez permiten acceder al

estudio de sistemas más grandes y en escalas de tiempo comparables con los métodos experimentales.

Esta tesis comienza desde el estudio de algunas propiedades de interés relativas al agua pura, analizando principalmente aquellas que dan cuenta de la coexistencia de dos estados de organización estructural diferente. Este estudio, además, fue realizado de tal manera de explorar las diferencias en el comportamiento y la estructuración de dos modelos matemáticos de agua (TIP5P y SPCE) muy populares, utilizados frecuentemente como agua de hidratación para la investigación de otros sistemas de interés. En el contexto más general de la tesis, este estudio no solo brinda información de utilidad sobre el comportamiento del agua, los tipos de estructura esperables en distintas condiciones, etc., sino que, además, otorga algo de práctica e intuición necesaria en la inspección de algunos parámetros que más tarde serán examinados también en ambientes más complejos, tales como el índice de estructura local (o LSI por sus siglas en inglés). En el capítulo correspondiente a este tema veremos que el entendimiento de las estructuras del modelo de dos estados, que generalmente son clasificadas como “agua de alta y baja densidad”, poseen, además, una variedad estructural que puede ser relevante para su estudio en otros contextos.

Aumentando el nivel de complejidad, según lo previsto, en el siguiente capítulo se van a analizar las particularidades del agua confinada en espacios nanométricos y subnanométricos, su comportamiento en superficies y como éstas propiedades se han utilizado para caracterizar químicamente estos sistemas. También exploraremos la dificultad que existe para establecer intuitivamente una relación entre hidrofobicidad y química. Particularmente, vamos a examinar a fondo el caso del grafeno, cuyo comportamiento, según hemos demostrado, tiende a ser más parecido a los sistemas clásicamente hidrofílicos, pese a ser utilizado durante mucho tiempo incluso como superficie modelo de hidrofobicidad.

A continuación, veremos que establecer el carácter hidrofóbico o hidrofílico de una superficie tiene aún más aristas que las procedentes del análisis de la química implicada.

Para finalizar los estudios presentados en el capítulo 3, demostraremos la relación que existe entre el comportamiento del agua confinada y la geometría

de las cavidades a las que se la expone. En este sentido, demostraremos cómo un sistema de características químicas invariables puede comportarse dramáticamente distinto, dependiendo del radio de su curvatura superficial.

Hasta aquí habremos alcanzado apenas la superficie de los motivos que sustentan esta tesis. Como veremos, el tema del agua de hidratación dista mucho de lo que supone el dicho popular “claro como el agua”; pero, descubrir los patrones de comportamiento en estos sistemas conceptualmente sencillos, nos proporcionará la posibilidad de adentrarnos en terrenos mucho más complejos e interesantes.

Como se dijo anteriormente, el agua interviene de un modo para nada trivial en muchos procesos de ensamblado molecular; de hecho, algunos de estos mecanismos ocurren como resultado directo de la influencia del agua: por ejemplo, el denominado “colapso hidrofóbico” (descrito más adelante) sucede debido a una situación de compromiso termodinámico por el cual el agua obtiene una ganancia en entropía tras el ensamble que alcanza para justificar su ocurrencia.

El paso siguiente en complejidad, antes de poder afrontar las exigencias conceptuales que requiere el estudio de sistemas reales como interacciones en medios biológicos, es la incorporación de inhomogeneidades locales e interacciones de largo alcance en sistemas modelo. Este enfoque permite un estudio sistemático y controlado en el que poder estudiar, no solo el comportamiento del agua en confinamiento, sino, también, las implicancias del mismo sobre las interacciones que allí se desarrollan. En este capítulo, que cumple una función trascendental en este trabajo, se tratará de establecer las relaciones de causalidad que conectan estructura y función. A partir de aquí, se pretende conciliar el doble enfoque hidratación-binding en uno más general que sirva de desambiguación para la dialéctica mencionada al comienzo.

Finalmente, con el background conceptual y técnico acumulado hasta aquí, se estudiarán en el último capítulo algunos procesos de reconocimiento en la unión de proteínas, conceptos generales sobre regulación alostérica, defectos de hidratación y binding, particularidades de los llamados "hot spots" (o sitios relevantes para la energía de unión) en proteínas y finalmente, como estas observaciones podrían ser empleadas en el diseño racional de drogas, modificación de proteínas, etc.

Antes de avanzar sobre el marco teórico pertinente, resta mencionar que cada artículo publicado durante el periodo de escritura de la tesis tiene su propio valor científico. Es por este motivo que algunas de las características que le agregan valor de divulgación individualmente quedan un poco por fuera de las de los objetivos propuestos, pero, aún así, van a ser incluidos en el cuerpo conceptual porque son complementarios de los ejes centrales de este trabajo.

Marco teórico y estado del arte.

Como es de suponer, el agua es probablemente uno de los compuestos químicos más estudiados de la historia de la ciencia. Cientos de papers han sido publicados, aún contando sólo aquellos referidos al estudio del agua pura. Una revisión histórica del conocimiento acumulado en esta materia escapa por mucho el alcance de este trabajo de tesis y es, por lo mismo, muy difícil establecer el estado del arte. Es interesante mencionar que, todavía en estos días, hay literatura imprescindible para el abordaje de estas temáticas escritas incluso desde los años setentas.

Si es cierto que, con el desarrollo exponencial de las tecnologías en estos últimos años, sobre todo en lo que refiere a la posibilidad de estudiar sistemas de dimensiones cada vez más pequeñas, se produjo un salto en la cantidad y calidad de los trabajos publicados sobre las propiedades del agua pura como así también de hidratación y confinada.

Tanto las mejoras en técnicas experimentales como de modelado computacional hacen posible el seguimiento de propiedades de escala molecular, invisibles al medir sus equivalentes de escala macroscópica.

Por todo lo anteriormente mencionado, se presentara aquí un marco teórico global, haciendo hincapié en aquellos conceptos absolutamente necesarios para abordar la generalidad de los contenidos de la tesis. Asimismo, cada capítulo contará con su propia introducción teórica, a fines de facilitar su lectura y de dividir las herramientas conceptuales específicas de un modo más claro y eficiente.

El agua: generalidades, estructura y modelado.

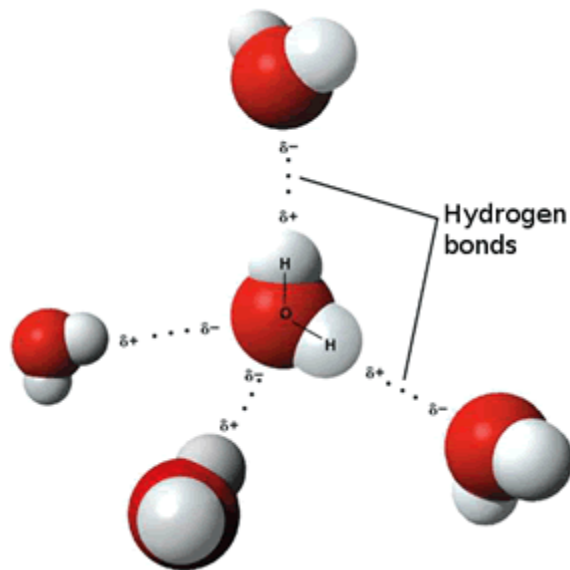


Figura 1: tetraedro de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno

El agua, de fórmula química H_2O es una molécula pequeña, de bajo peso molecular, constituida por dos átomos de hidrógeno unidos covalentemente al oxígeno formando una ángulo de aproximadamente 104° medidos experimentalmente. Es una molécula eléctricamente neutra pero polar, con una concentración de densidad negativa sobre oxígeno, que deja una carga parcial positiva sobre los átomos de

hidrógeno.

Más allá de la estructura de enlaces covalentes de la molécula de agua, gran parte de sus propiedades se deben a la posibilidad de formación de los denominados puente de hidrógeno (HB por sus siglas en ingles)³. El puente de hidrógeno es una interacción electrostática tradicional entre la carga negativa del oxígeno de una molécula y la carga positiva de uno de los hidrógenos de la otra, con la particularidad de necesitar de una geometría bastante específica para maximizar su eficiencia. Cada molécula de agua tiene la capacidad de formar cuatro puentes de hidrógeno, dos desde sus hidrógenos deficientes de electrones y dos a partir de los dos pares de electrones libres sobre el oxígeno. La característica direccional de los puentes de hidrógeno determina la formación de los característicos tetraedros en la estructura del agua. En el agua solida estos tetraedros se extienden espacialmente para dar forma a la estructura cristalina, mientras que en estado líquido existe, más bien, una estructura tetraédrica local que se ve distorsionada a mayores distancias por las fluctuaciones térmicas de las moléculas. El agua presenta muchísimas anomalías en sus propiedades si se la compara con otras moléculas semejantes. En gran medida, estas particularidades se deben de uno u otro modo a las características especiales de la red de puentes de hidrógeno que las conectan. Finalmente, es útil mencionar que la presencia de puentes de hidrógeno en el agua representa una especie de compromiso termodinámico

entre la energía del enlace y las restricciones conformacionales que suponen sus requerimientos geométricos.

Una de las anomalías en el comportamiento del agua respecto a otras sustancias similares, de particular interés a lo largo de este trabajo, es su elevada constante dieléctrica. La capacidad de un material de comportarse como un buen dieléctrico procede de su potencial para ser polarizado en presencia de un campo eléctrico. En el caso del agua, la constante dieléctrica observada es anormalmente alta aún para una sustancia polar. Esto se debe a que, más allá de la capacidad del dipolo de alinearse localmente, existe un comportamiento cooperativo de alineación, debido a la transferencia de este efecto a lo largo de la red de puentes de hidrógeno. Como hemos mencionado anteriormente, para el entendimiento de muchas de las características que tienen las interacciones en agua, es necesario familiarizarse con las implicancias de su capacidad para formar puentes de hidrógeno.

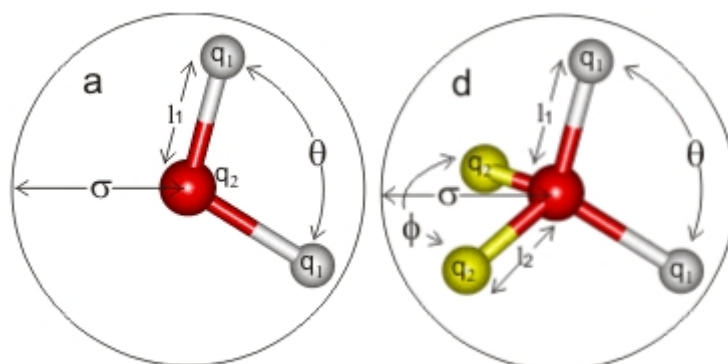


Figura 2: parámetros del modelo de agua

Modelo	σ Å	ϵ KJ/mol	l_1 Å	l_2 Å	q_1 (e)	q_2 (e)	θ°	ϕ°
SPC/E	3.166	0.650	1.0000	-	+0.4238	-	109.47	-
						0.8476		
TIP3P	3.151	0.6364	0.9572	-	+0.4170	-	104.52	-
						0.8340		
TIP5P-Ew	3.097	0.7448	0.9572	0.70	+0.2410	-	104.52	109.47
						0.2410		

Tabla 1: parámetros utilizados en los modelos de agua SPC/E, TIP3P y TIP5P-EW.

Antes de explorar las consideraciones teóricas adicionales que se deben hacer para el estudio del agua en nanoconfinamiento y superficies, solo resta

mencionar los modelos de agua más populares entre la comunidad científica y sus particularidades. Como este trabajo se centra en el estudio mediante experimentos de dinámica molecular (MD), es necesario comprender las características paramétricas de cada uno de los modelos utilizados y como estos parámetros resultan en diferencias de comportamiento en las simulaciones.

En la figura y la tabla anterior se resumen los parámetros matemáticos utilizados para la construcción de los modelos que se implementaran a lo largo de esta tesis³. Como cabe suponer, la variedad de modelos de agua surge debido a la necesidad de reproducir distintas propiedades medidas experimentalmente. Por supuesto, a medida que los modelos se complejizan (como por ejemplo de TIP3 a TIP5) se pueden obtener propiedades medibles más cercanas al comportamiento real del agua.

Existe en este sentido toda una gama de modelos que van desde los denominados de grano grueso (que es una representación super-simplificada de la molécula entera) hasta aquellos que simulan, incluso, los movimientos de polarización de cada molécula. No siempre es así; pero, en general, un mejor nivel de detalle, reproduce mejor el comportamiento real; sin embargo, al mismo tiempo, eleva considerablemente los tiempos de cómputo.

Dentro de los modelos más sencillos, se busca optimizar los parámetros para representar al menos algunas de las propiedades fundamentales, dependiendo de las necesidades del estudio que se va a realizar. Por mencionar algún ejemplo, la temperatura de fusión para el modelo TIP3P es de 215K y, aún así, este modelo sigue siendo uno de los preferidos como agua de hidratación de sistemas biológicos. En contraste, TIP5P es un modelo en el que se observa una buena concordancia con la temperatura de fusión, pero que, entre otras cosas, no produce hielo hexagonal (I_h) como estructura de hielo más probable. El hielo hexagonal es la forma cristalina más común de todo el hielo y la nieve en la naturaleza, constituida por el arreglo tetraédrico de todas las moléculas de agua en la red.

Agua en superficies y entornos nanoconfinados.

Al lector avezado en los temas que se tratan en esta tesis no le puede pasar inadvertido el escaso desarrollo de los conceptos generales del marco teórico

que aquí se describe. Afortunadamente también sabrá que no es posible discutir (ni siquiera citar) todo el abanico que conforma el conocimiento acumulado a lo largo de la historia. En todo caso, cabe mencionar que lo que aquí se detalla es simplemente un recorte arbitrario del estado general del conocimiento sobre el agua, sesgado por las propias necesidades de este trabajo.

El comportamiento del agua, tanto en interfaces como confinada en espacios nanométricos, es radicalmente diferente de aquel que se observa en agua pura masiva (de aquí en más "bulk"). Este desvío de sus propiedades respecto de las esperables macroscopicamente ya lleva algún tiempo en el bagaje de conocimiento científico general y, de hecho, ha sido extensivamente probado experimentalmente y sujeto a discusión teórica⁴⁻¹².

Para entender lo que ocurre en el confinamiento a esa escala es necesario poder imaginarse lo que "siente" cada molécula individualmente y poder abstraerse de las propiedades macroscópicas a las que la intuición puede guiar naturalmente.

No es difícil suponer en este punto, que de nuevo, las diferencias en comportamiento del agua confinada están íntimamente relacionadas con la capacidad de formación de puentes de hidrógeno bajo estas circunstancias especiales. En efecto, lo que ocurre en condiciones de interacción interfacial es que las moléculas de agua entran a un estado de compromiso estructural y termodinámico por el cual se ponen en conflicto varios factores: primero la limitación espacial de no poder acomodar los cuatro puentes de hidrógeno característicos que mencionamos anteriormente, segundo la capacidad de interaccionar con la superficie sobre la que hace contacto y, finalmente, las restricciones conformacionales que resultan de maximizar los dos factores anteriores. Se podría decir que los primeros dos casos se relacionan con factores entálpicos del proceso mientras que el último tiene que ver más con el sacrificio en entropía que se produce.

Como veremos en el capítulo específico en el que se tratan estos temas, la permutación de estos tres factores da lugar a fuerzas muy importantes en sistemas nanoconfinados. De hecho, desde los inicios de la investigación de las características fisicoquímicas que producen estos cambios en el

comportamiento del agua, se ha hecho un esfuerzo muy grande por clasificar las superficies según el efecto que producen.

Básicamente las superficies se pueden clasificar en “hidrofilicas” o “hidrofóbicas” que significan literalmente “amantes o temerosas del agua” respectivamente. De cualquier modo, ya se puede entrever que los límites no son tan claros en esta división binaria. En teoría, todas las superficies deberían comportarse de una u otra forma, esto es, interaccionar o no con el agua; sin embargo, la realidad es un poco más compleja que esto. Hoy en día, como demostraremos en parte en nuestro trabajo, no existen lineamientos claros para predecir, a ciencia cierta, el comportamiento de una determinada superficie en agua. Se sabe, no obstante, que el comportamiento del agua depende al menos de dos factores^{7,13}: la topografía y la química de la superficie. En general, una geometría superficial más rugosa incrementa su hidrofobicidad y una química de características más polares incrementa la hidrofiliidad.

Curiosamente, una gran parte de los conocimientos que se van acumulando respecto de los efectos del agua en confinamiento proceden de una amplia gama de disciplinas, en principio porque, una vez reconocida la importancia de su efecto, son las propias necesidades de su entendimiento en campos como la biología molecular, la biofísica, la farmacéutica, la ciencia de materiales, etc. las que impulsan su desarrollo. Por supuesto, una vez entendida su relevancia, también existen revisiones teóricas^{4,5,7,10,14–19} de los comportamientos observados experimentalmente.

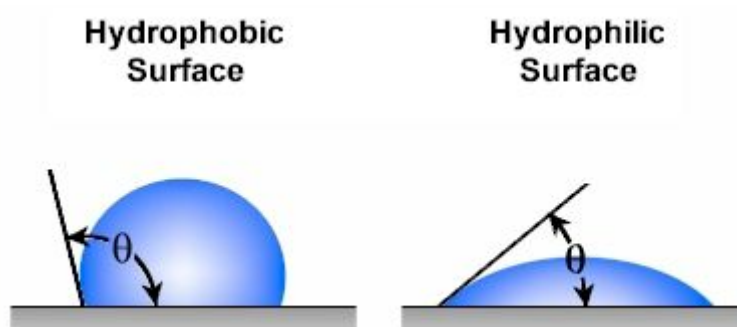


Figura 3: ángulo de contacto (o ángulo de gota) utilizado para caracterizar el grado hidrofobicidad en superficies. Izquierda: superficie hidrofóbica ($\theta > 90^\circ$). Derecha: superficie hidrofílica: ($\theta < 90^\circ$)

Sin embargo, pese a los esfuerzos por comprender la naturaleza del comportamiento del agua confinada, existen preguntas fundamentales que no han podido ser completamente respondidas: ¿cuánto se extiende el efecto de

la superficie sobre el agua?, ¿es homogéneo el comportamiento en superficies o es preciso pensar en contextos de hidrofobicidad local? Si no se trata de fenómenos isotrópicos, ¿qué análisis permiten calificar unívocamente la hidrofobicidad de una superficie? Como veremos más adelante, se han documentado casos de superficies polares comportándose hidrofóticamente²⁰ y otras, completamente apolares, mostrando un carácter hidrofílico (ver capítulo 3). En todo caso, empieza a resultar una obviedad que la observación de características “continuas” de los sistemas no alcanzan para describirlos completamente (por ejemplo, el ángulo de gota tantas veces utilizado puede derivar en conclusiones equivocadas⁵)

Naturaleza de las interacciones no covalentes, la importancia del medio:

A grandes rasgos, se denomina interacciones no covalentes a aquellas uniones intra o inter moleculares en las que no se comparten electrones. Dentro de esta clasificación se enmarcan principalmente todos los tipos de interacciones electrostáticas pero, también, aquellas más difícilmente catalogables como, por ejemplo, el efecto hidrofóbico.

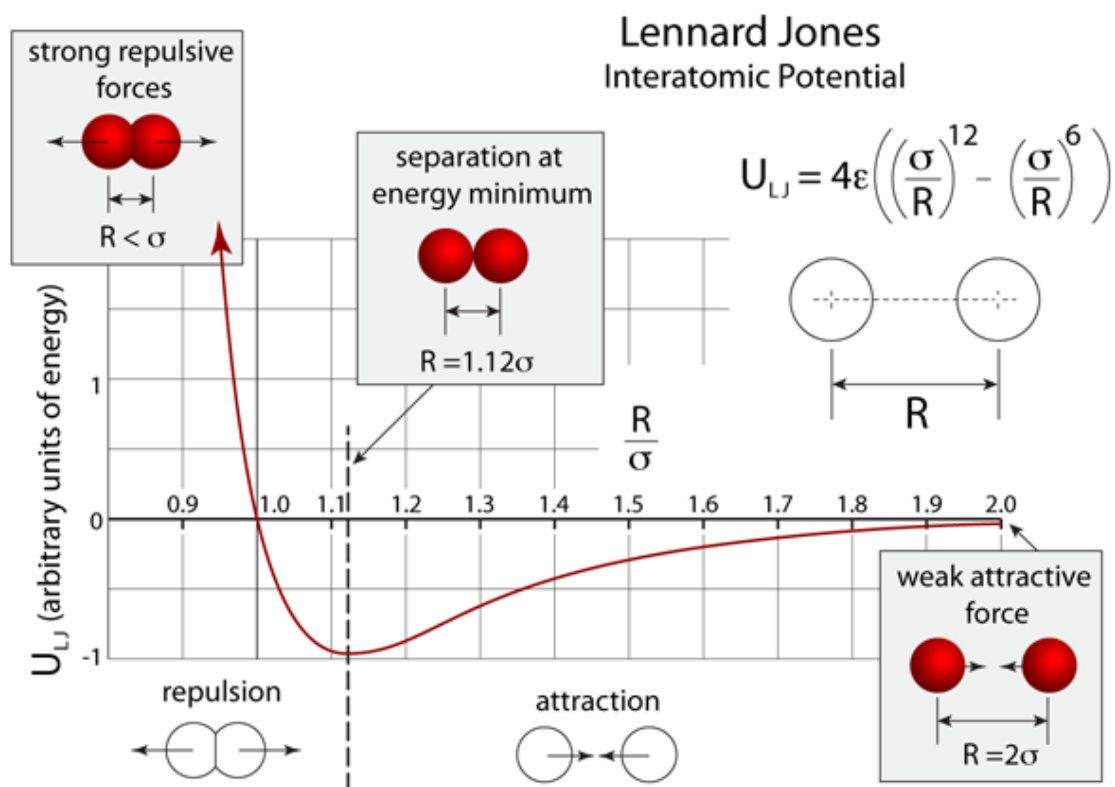


Figura 4: potencial de interacción de Lennard-Jones

En el contexto de la dinámica molecular, estas interacciones son a menudo simplificadas para facilitar su consideración matemática. El caso más evidente es el de las llamadas interacciones de Van der Waals o interacciones de corto alcance. Las interacciones de Van der Waals surgen de la interacción electrostática instantánea de los distintos componentes de los sistemas fisicoquímicos y están presentes en todos ellos. En simulaciones de dinámica molecular, estas interacciones se simplifican, ajustándolas a un potencial que reproduzca los efectos observados experimentalmente a un bajo costo computacional; por lejos el potencial más utilizado es el de Lennard-Jones o potencial 6-12.

Como puede verse en la figura 4, las interacciones de Lennard-Jones se caracterizan por tener una fase atractiva débil, que decrece rápidamente con la distancia (a la sexta potencia) y una parte repulsiva fuerte que aumenta aún más rápidamente con la distancia inter partícula.

Si bien es imprescindible mencionar en el marco teórico las características de las interacciones de Van der Waals, esta tesis está más focalizada en el entendimiento de otros tipos de interacciones no covalentes: el puente de hidrógeno y la interacción entre cargas.

En el caso de las interacciones de carga, se siguen en dinámica molecular los mismos principios de aplicación de la ley de Coulomb de cargas estacionarias, esto es:

$$F = \frac{1}{4 \pi \epsilon_0} \frac{|q_1 q_2|}{r^2}$$

Siendo ϵ_0 la permitividad eléctrica en el vacío, “q” las respectivas cargas y “r” la distancia entre ellas. Como puede observarse, las interacciones de carga o coulombicas decaen mucho más lentamente con la distancias que las de Van der Waals. Otra característica importante en la historia de la implementación de la ley de coulomb en medios materiales (condiciones distintas de las de vacío) es la incorporación de un término adicional en el denominador llamado “permitividad relativa” o “constante dieléctrica”.

La constante dieléctrica es un término que surge de la observación experimental del comportamiento de los campos eléctricos en medios

materiales y básicamente da cuenta de la magnitud del efecto del material respecto de la intensidad de ese mismo campo medido en vacío. Pese a ser la constante dieléctrica una propiedad de los materiales conocida por mucho tiempo, aún hoy en día tiene a ser olvidada cuando se estudian problemás de interacción electrostática. En particular nos interesa estudiar aquí el caso del agua como medio de interacción. De hecho, como se mencionó con anterioridad, el agua presenta una constante dieléctrica inusualmente alta (aproximadamente 80 a temperatura ambiente); lo que en principio podría dar a entender que las interacciones de carga en agua son irrelevantes. No obstante, se sabe que la mayor parte de las interacciones en medios biológicos (i.e. acuosos) ocurren con mediación de residuos cargados²¹⁻²³. ¿Cómo es esto posible? La respuesta a esa pregunta puede aproximarse entendiendo el origen molecular de la constante dieléctrica.

La polarización de sistemas líquidos polares, se debe principalmente a la orientación de los dipolos moleculares. En general, cuanto mayor sea la polaridad molecular del líquido, mayor será su constante dieléctrica. Este tipo de comportamiento fue descrito con bastante éxito por Onsager a finales de los años treinta²⁴.

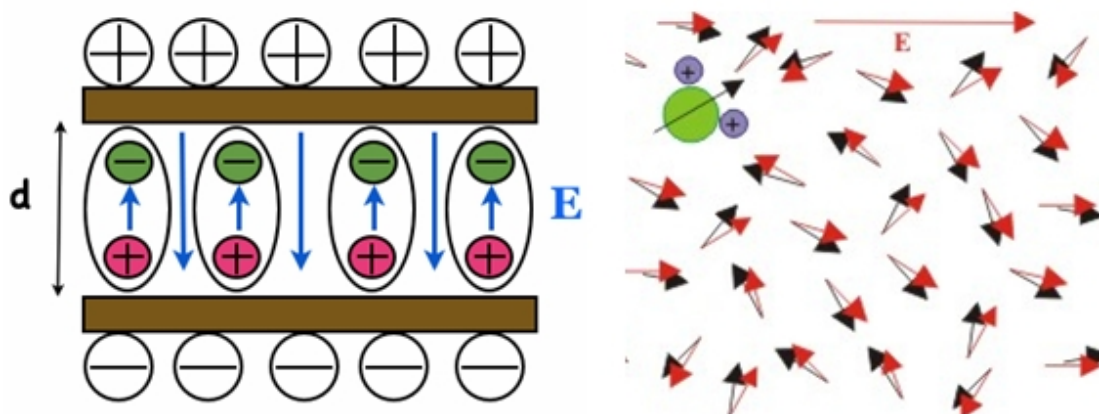


Figura 5: izquierda: esquema típico de polarización de sistemas polares en presencia de un campo eléctrico externo. derecha: esquema más realista de alineación con el campo.

Sin embargo, rápidamente se comprobó que el tratamiento de Onsager no alcanzaba para describir el comportamiento dieléctrico de líquidos "asociados", particularmente, que no podía predecir la elevada constante dieléctrica del agua ($\epsilon_{\text{agua}} = 80$, $\epsilon_{\text{acetona}} = 20.7$, $\epsilon_{\text{acetonitrilo}} = 37.5$). Más adelante, estudios publicados por Kirkwood²⁵ y Fröhlich²⁶, extienden la interpretación de Onsager, teniendo en cuenta la interacción entre moléculas vecinas del líquido. Así, para

sustancias como el agua; con una inusual capacidad para asociarse tridimensionalmente por puentes de hidrógeno; la capacidad de polarización y, por lo tanto, la constante dieléctrica; se ven incrementadas. Para no extender esta explicación de carácter introductorio, esto se puede interpretar resumidamente como un aumento de la polaridad conjunta del solvente, respecto del momento dipolar individual de las moléculas que lo componen.

Existen en la literatura varios experimentos interesantes (Hasted²⁷, Okazaki²⁸, Lyklema²⁸, etc.) y tratamientos teóricos (Nagle²⁹) que prueban que la red de puentes de hidrógeno en realidad se opone a la alineación individual de las moléculas de agua con el campo eléctrico externo. Como resultado, solo se alinean las moléculas más cercanas a las cargas, mientras que las más alejadas siguen el ordenamiento geométrico que les impone la red de puentes de hidrógeno, esto provoca un exceso de cargas en el material solo superficial y, por consiguiente, una mayor momento dipolar global ($\mu = q \cdot d$).

A la luz de estas interpretaciones, y recordando lo explicado sobre los efectos observados en el agua en confinamiento y superficies, no nos debe sorprender que la constante dieléctrica efectiva en sistemas químicos complejos diste mucho de lo esperable para el agua bulk.

El concepto de constante dieléctrica va a ser revisitado a lo largo de todo el desarrollo de la tesis; sin embargo, es propicio aclarar que su utilización no es del todo correcta. Estrictamente hablando, la constante dieléctrica es una propiedad de los sistemas macroscópicos; por lo tanto, debe entenderse su uso apelando a su sentido histórico.

Más allá de las interacciones entre cargas formales detallada anteriormente, por supuesto que en ese orden de importancia habría que mencionar el caso especial de los puentes de hidrógeno, pero, dado que ya se introdujo el tema en el marco de las propiedades del agua, se va a omitir aquí su desarrollo.

Para terminar de componer todo el marco teórico actual necesario para el entendimiento de las interacciones en agua, hace falta introducir una posibilidad más de interacción conocida como efecto hidrofóbico. Para entender el efecto hidrofóbico es preciso mencionar que la energía libre involucrada en el proceso de hidratación de cuerpos hidrofóbicos es siempre positiva, es decir, es un proceso no espontáneo o energéticamente desfavorable. Si bien la primeras presunciones adjudicaban esta característica

a un valor también positivo en la contribución entálpica (dada la falta de afinidad entre el hidrófobo y el agua), Evans y Frank demostraron en 1945 que en realidad, la no espontaneidad del proceso se debe principalmente a la pérdida de entropía del sistema³⁰. Este pérdida de entropía se puede explicar a nivel molecular por el grado de ordenamiento adicional que impone justamente el factor entálpico: El agua tiende a minimizar el contacto con el hidrófobo (con el que interactúa pobremente) y a maximizar la red de puentes de hidrógeno con sus pares. En pocas palabras, el agua sobre la superficie hidrofóbica se encuentra más "ordenada" o estructurada que el agua en el seno de la solución. Entendido lo anterior resulta relativamente simple deducir el origen de la energía favorable de interacción entre dos cuerpos hidrofóbicos en agua:

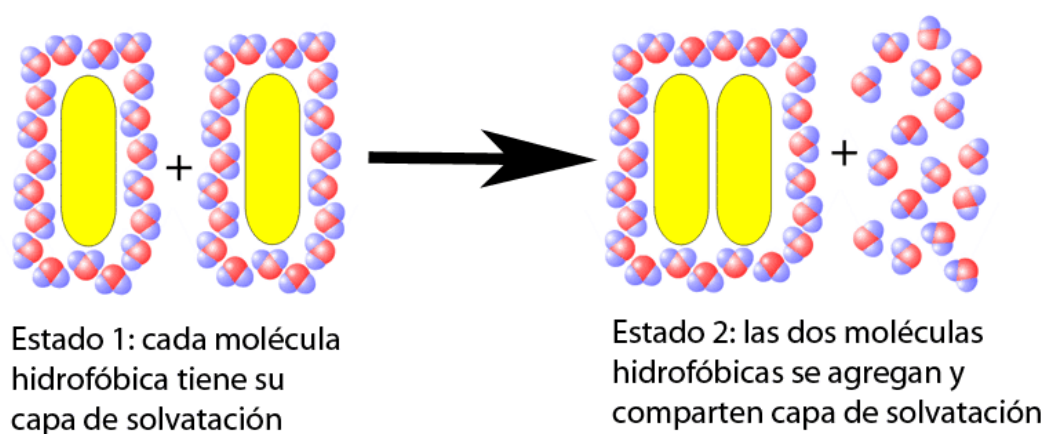


Figura 6: justificación entrópica del colapso hidrofóbico

Como puede verse en la figura 5, la unión de dos cuerpos hidrofóbicos minimiza la superficie de contacto entre el hidrófobo y el agua, liberándose en el proceso algunas moléculas de la interfase. Estas moléculas retornan al seno de la solución, donde pueden completar sus cuatro puentes de hidrógeno característicos (reducidos normalmente a tres en la interfase) y poseen además, un mayor número disponible de microestados de idéntica entalpia, o, en otras palabras, una mayor entropía. Es interesante notar que este tipo de motivo de unión, si bien energéticamente favorable, difiere en naturaleza con el resto de las interacciones no covalentes que hemos mencionados, puesto que no se trata de una interacción específica entre los dos cuerpos hidrofóbicos intervinientes, sino, más bien, el efecto secundario de maximizar otras tantas. La contundente relevancia del efecto hidrofóbico como motivo de unión en la

naturaleza (se cree por ejemplo que dirige el plegamiento de proteínas) nos da una idea de la necesidad de no desatender la influencia que puede tener el agua, más allá de la propia identidad fisicoquímica de las demás moléculas intervinientes.

Interacciones en contexto: estudio sobre proteínas

Es interesante siempre en un marco teórico explicar no solo lo que se conoce (el estado del arte) sino también lo que no se conoce de la materia, más aún, cuánto se ignora de lo que se ignora.

Como fue mencionado en la introducción, el primer objetivo de esta tesis fue el estudio de las interacciones relevantes en medios biológicos, principalmente tendiente al entendimiento y desarrollo de técnicas de diseño racional de fármacos y proteínas³¹⁻³³. Aún con un sólido background del grupo de investigación en la materia, en muchos casos acompañado de la colaboración de referentes en el tema como el profesor Ariel Fernández, resultó evidente luego de nuestro primer acercamiento con la problemática³¹, la necesidad de establecer conceptos aún no abordados por la literatura actual. La satisfacción de esas necesidades es lo que finalmente da cuerpo a todo este trabajo, para revisar los resultados obtenidos en el estudio de proteínas.

Las proteínas, y en general todas las estructuras químicas presentes en organismos vivos, a través de un larguísimo proceso de evolución, lograron lo que cualquier químico contemporáneo solo es capaz de soñar: desarrollaron toda su química en agua y en condiciones normales de presión y temperatura. De hecho, las proteínas poseen una química muy compleja, de extraordinaria eficiencia energética, muy alta sensibilidad y especificidad; todo esto resultante de la permutación de apenas una veintena de aminoácidos (las unidades fundamentales que las componen). La capacidad de las proteínas de interactuar químicamente y, por lo tanto, de cumplir con su función biológica deriva casi exclusivamente de su estructura. La organización estructural de las proteínas consiste en cuatro niveles de complejidad: la estructura primaria, que es la unión covalente de los aminoácidos que la componen; la estructura secundaria, que es la primera etapa de organización espacial, formada a partir de la interacción por puentes de hidrógeno de los grupos carbonilo y amino de la cadena principal (que otorgan la denominada estructura local de la proteína); la

estructura terciaria, que constituye la disposición tridimensional de la proteína en el espacio y, finalmente, la estructura cuaternaria que consiste en la asociación de varias subunidades proteicas.

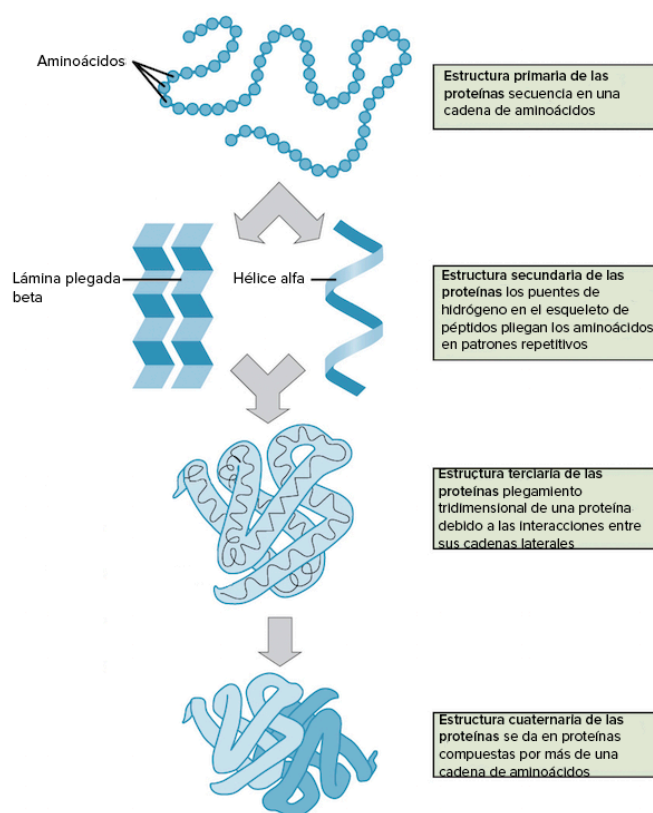


Figura 7 jerarquías de organización estructural en proteínas.

Sin embargo (y esto será discutido extensamente en el último capítulo), las proteínas son moléculas flexibles, por lo que hablar de estructura es, más bien, hablar de una dinámica estructural. Existe todo un paisaje conformacional para una misma proteína, con mayor o menor población (probabilidad) de estructuras preferidas, de acuerdo con su estabilidad relativa en ese ensamble. Como veremos más adelante, una de las técnicas más utilizadas para determinar la estructura de una proteína es la cristalografía de rayos x que, en realidad, lo que captura es justamente aquella estructura más probable (más estable) y, por lo tanto, más veces visitada en la dinámica. Sin embargo, ya ha sido sugerido³⁴ que, tal vez, aquellas conformaciones estructuralmente más defectuosas, son las que poseen mayores potencialidades adhesivas. Ya se verá en el último capítulo que algunas de las particularidades de las estructuras menos estables, en efecto, cumplen un rol fundamental en la fisicoquímica de

interacción y que están, en última instancia, justificadas por sus características locales de hidratación.

Cuando se pretenden elucidar los mecanismos detrás de los fenómenos de unión ("binding") en sistemas complejos como las proteínas se deben tener en cuenta varios factores, a menudo interdependientes: la facilidad de remoción de agua, la fuerza de las interacciones resultantes, el balance entrópico entre sustratos y productos, etc. Uno de los esfuerzos clave en la interpretación de estos problemas por parte del grupo de investigación en el que fue gestada esta tesis está puesto, justamente, en el entendimiento de esa interrelación entre las causas de unión; por contraposición a la concepción general del problema figurado incluso según el "principio de Gulliver", o la suma de muchísimas contribuciones pequeñísimas (muchas cuerdas diminutas para atar un gigante), cuando en verdad esas contribuciones no tienen por qué ser aditivas¹².

Es tanto lo que se ignora en lo relativo a estas problemáticas que, en el estado actual del conocimiento en materia de diseño de drogas, por ejemplo, es más económico el descubrimiento de nuevos fármacos por ensayo de prueba y error que por medio de la optimización racional de motivos químicos compatibles con cada proteína de interés. Más allá de esto, de a poco van surgiendo algunos trabajos que, de alguna manera, apuntan hacia el mismo horizonte que esta tesis y que constituyen el cimiento teórico y experimental sobre el que fue construida³⁵⁻³⁸.

Antes de adentrarnos en el cuerpo del trabajo, me permito establecer una síntesis del hilvanado conceptual que se pretende respetar, con la intención de establecer una guía para el lector, más no una condicionante para la interpretación de los resultados posteriormente exhibidos.

Síntesis conceptual

Los procesos que gobiernan los modos de unión en sistemas complejos en medio acuoso son siempre los mismos: ya sea que se trate de interacciones proteína-proteína, proteína-ligando, materiales autoensamblados, interacciones de membrana, ensamblado supramolecular, etc., la característica que

comparten todos ellos es que son fenómenos de superficie, en su mayoría mediados por interacciones del tipo no covalente.

Como hemos visto, la primera herramienta indispensable para el entendimiento de estos procesos es la profunda comprensión de las características que dictaminan el comportamiento del agua. Una vez establecidos estos principios, su aplicación en el entendimiento de la fisicoquímica del agua nanoconfinada y superficial se manifiesta muy naturalmente. En última instancia, casi todas las diferencias de comportamiento observadas surgen de la necesidad de optimización estructural de la red de puentes de hidrógeno y su relación de compromiso con la restricción de libertad conformacional que eso impone.

Si la comprensión del comportamiento del agua de hidratación fuera completo, si se pudiera determinar la hidrofobicidad de los sistemas de estudio en base simplemente a sus características físicas y químicas, entonces, el discernimiento de la relevancia de las interacciones electrostáticas en contexto sería casi inmediato. Uno de los problemas con este enfoque es que, a menudo, la hidrofobicidad de los sistemas y el comportamiento del agua son características interdependientes: la presencia de cargas altera la hidrofobicidad y el cambio del comportamiento del agua altera la fuerza de la interacción de cargas. Como veremos más adelante, podemos establecer algunas presunciones si entendemos el carácter local de la hidrofobicidad. En concreto, se puede encontrar, prestando atención a los ejemplos de la naturaleza, que existe una combinación inteligente de carga e hidrofobicidad, mucho más provechosa que la suma de esas partes³⁹.

Finalmente, a partir del entendimiento de la capacidad de modular interacciones electrostáticas, pueden establecerse los lineamientos esenciales, tanto para la identificación de sitios de unión en proteínas como para el diseño de ligandos optimizados. Así mismo, esos conceptos utilizados para la comprensión de los mecanismos de unión molecular pueden ser aprovechados para la racionalización de la dinámica estructural de las proteínas y la detección de estados transitorios de mayor reactividad.

Capítulo 2

Estructura y dinámica de agua pura líquida y en regímenes sobreenfriados

Introducción

Como hemos mencionado en la introducción de la tesis, pese a ser el agua una de las sustancias más abundantes del planeta, la comprensión de su comportamiento fisicoquímico dista mucho de ser completo^{7,40-46}. Particularmente, el agua líquida posee una serie de anomalías que pueden ser derivadas de dos estados de estructuración local en competencia, estos dos estados se caracterizan por poseer una alta y baja densidad local respectivamente^{40,47-53}.

En la figura mostrada a continuación, se puede observar la complejidad del escenario de fases, con las condiciones de presión y temperatura que les dan origen.

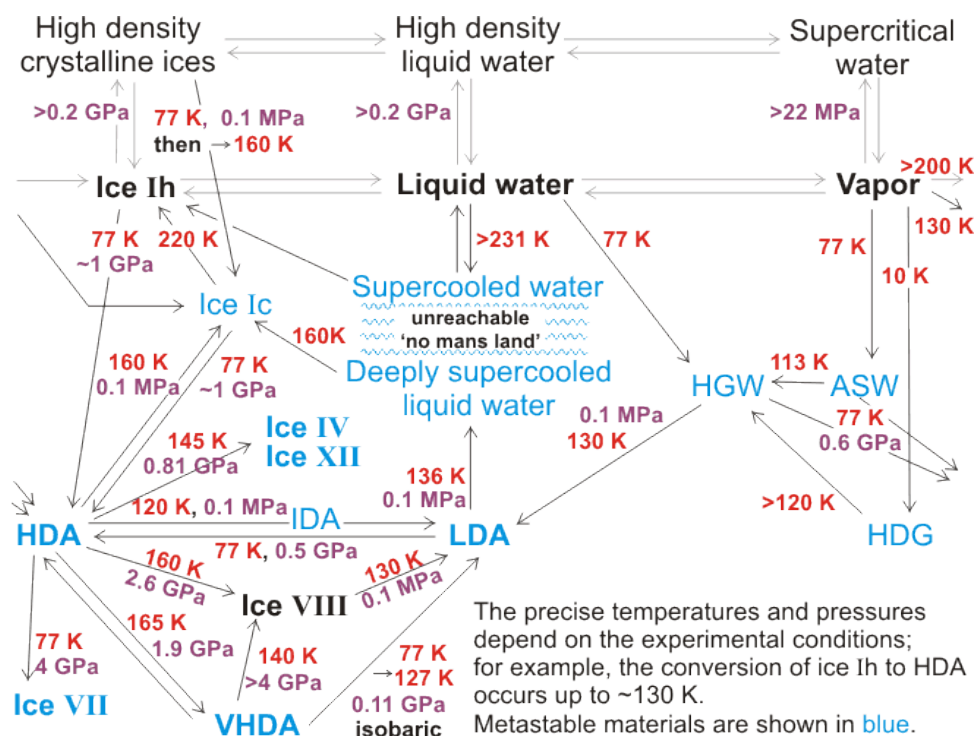


Figura 8: diagrama de fases del agua.

En este capítulo nos centraremos en el estudio de agua líquida y líquida sobreenfriada, sin embargo, para comprender el desarrollo conceptual que será desarrollado a continuación, es útil incluir una breve referencia de dos de las fases vítreas de mayor interés para la comunidad científica (HDA y LDA):

- HDA (high density amorphous ice) o hielo amorfo de alta densidad: se obtiene a partir de hielo hexagonal (Ih) por compresión a presiones superiores a los 10 kbar y a temperaturas de alrededor de 77 K⁵⁴.
- LDA (low density amorphous ice) o hielo amorfo de baja densidad: se puede obtener bien por calentamiento en vacío de ASW (amorphous solid water o agua solida amorfa) o bien por calentamiento de HDA a presión atmosférica⁵⁵.

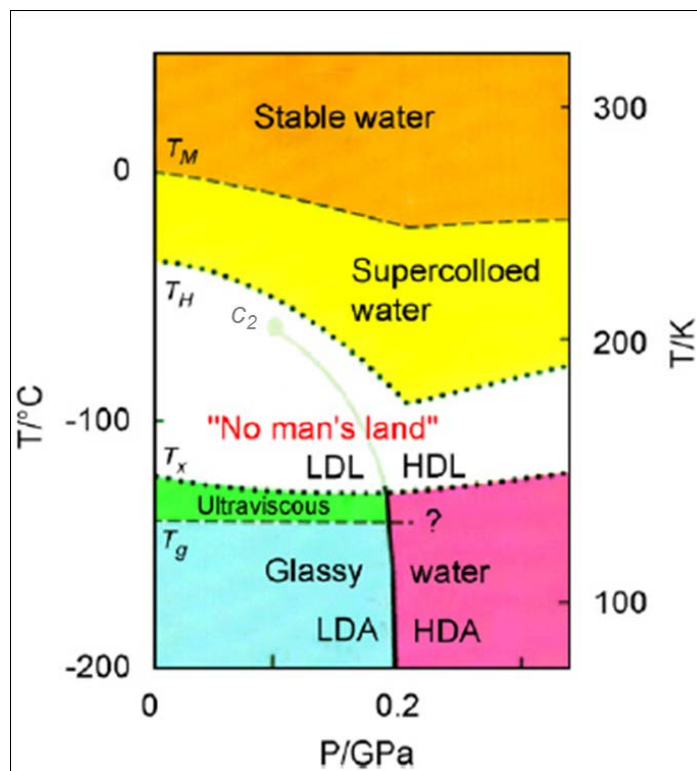


Figura 9: diagrama de fases a bajas temperaturas alrededor del régimen sobreenfriado

Como mencionábamos, las formas HDA y LDA presentan gran interés para el estudio de sistemas vítreos dado que presentan el primer caso conocido de transición de fase de primer orden entre dos sólidos amorfos⁵⁵. Existe actualmente la hipótesis, que ha generado un fuerte debate en la comunidad científica por muchos años, de la existencia de una transición de fase líquido-líquido, ente agua líquida de alta densidad (HDL por sus siglas en ingles) y agua líquida de baja densidad (LDL) equivalente a la observada para entre

HDA y LDA en sólidos amorfos. Más allá de que la discusión de la transición de fase en sí misma excede los alcances propuestos para esta tesis, en este capítulo presentaremos pruebas que sustentan la teoría de coexistencia de dos estados tanto en el régimen de líquido normal como el líquido sobre-enfriado^{40,47-53}. Esta descripción basada en la organización de estructuras locales de distinta densidad, está inspirada en la probada coexistencia de los dos tipos de vidrios amorfos mencionados anteriormente^{56,57} y se supone, de hecho, que la transición de fase de primer orden líquido-líquido, no es más que la continuación de la línea de transición HDA-LDA a mayores temperaturas. Es esperable entonces, que pueda existir una distinción similar en el comportamiento del agua líquida, dando lugar tanto a estructuras de alta densidad local, desestructuradas, parecidas al HDA; como regiones de baja densidad local, alta estructura, análogas al LDA.

A lo largo de la historia de esta clasificación, se han desarrollado (con mayor o menor éxito) distintos tipos de índices, que permitan establecer una clara distinción entre las zonas de alta y baja estructura^{49,50,56-61}. Uno de esos indicadores, de probada utilidad en diferentes contextos (incluso en confinamiento), es el denominado "índice de estructura local" o LSI, que es sensible a la brecha que separa la primera de la segunda esfera de coordinación de una dada molécula de agua^{49,50}. De hecho se ha mostrado en un reciente trabajo⁵⁵ publicado por nuestro grupo que el LSI puede ser reinterpretado en contextos de confinamiento, con mucho más éxito que otros índices de estructura (como por ej. el índice "q"⁵⁵).

La implementación del índice de estructura local para el estudio de agua líquida, recientemente ha ganado cierta atención, debido a las pruebas presentas por nuestro grupo de investigación, de que al ser utilizado en conjunto con dinámicas moleculares posteriormente minimizadas, es capaz de obtener distribuciones bimodales de estructura local, tanto para agua líquida como en régimen sobre-enfriado⁴⁷. Cabe aclarar que la bimodalidad observada, que permite la clara distinción entre moléculas de agua de alta y de baja estructura, sólo es percibida de manera evidente en estructuras minimizadas (inherentes) y no en dinámicas reales.

Las llamadas estructuras inherentes corresponden a mínimos del paisaje de energía potencial obtenidos a partir de cada configuración de la dinámica real

del agua. Representa únicamente el componente configuracional de la energía, aislándola de las contribuciones térmicas (vibraciones anarmónicas) en el sistema⁶². La ventaja de la utilización de estructuras inherentes es la posibilidad de explorar todo el paisaje de energía potencial aún a alta temperatura: si bien este paisaje de energía viene determinado por el ensamble NVE y no depende de la temperatura, la trayectoria puebla según su energía térmica distintas porciones. En pocas palabras, las estructura inherente presenta la posibilidad de explorar los mínimos del paisaje de energía a partir de la dinámica molecular a alta temperatura, evitando así los problemas de ergodicidad que traería intentar explorar esos estados a muy baja temperatura.

Trabajos realizados por el grupo de investigación donde se desarrolla esta tesis, ya han demostrado, que cuantificando la fracción de moléculas estructuradas a diferentes temperaturas⁶³ se verifican las predicciones del llamado "modelo de los dos estados" del agua^{48,64} propuesto por Tanaka. Este modelo postula la coexistencia de dos estados; uno de mayor estructura, con el sustento entálpico que le otorga poseer puentes de hidrógeno de buena calidad (mejor geometría) y otra más desordenada, justificada por el incremento entrópico resultante de disponer de un mayor número de arreglos estructurales. se corrobora para este modelo, que la fracción de moléculas de un determinado tipo, puede ser descrita según un factor de Boltzmann, cuando el peso del factor expresa el grado de estabilización producido a partir de los puentes de hidrógeno de las estructuras bien constituidas, y el grado de desestabilización producto del incremento del volumen local^{48,63,64}. En otras palabras, el factor de Boltzmann debe considerar la ganancia de establecer puentes de hidrógeno de buena calidad y la pérdida que eso significa en densidad.

Actualmente, se ha aplicado satisfactoriamente el estudio de LSI en estructuras inherentes (IS) propuesto por nuestro grupo para distintos modelos de agua (SPC/E^{47,63}, TIP4-ice⁶⁵ y TIP4-2005⁶⁵). En todos los casos se ha podido evidenciar un claro comportamiento bimodal, con un punto de intersección entre las distribuciones que aparece invariante con la temperatura. Más recientemente, el grupo de Roberto Carr⁶⁶ ha logrado confirmar este escenario, por medio de técnicas de simulación ab-initio (o primeros principios).

Dado que sobre el final del capítulo estableceremos la relación entre las características estructurales del agua y su proceso de relajación dinámica, es preciso introducir someramente algunos conceptos necesarios derivados de los estudios de los mecanismos de relajación de sistemas vítreos. Con este objetivo, lo primero que debemos definir son las denominadas cuencas y metacuencas en el paisaje de energía potencial (PEL por sus siglas en inglés) del sistema. Como hemos mencionado con anterioridad, podemos entender las estructuras inherentes del sistema como mínimos locales del PEL, estos mínimos locales son denominados "cuencas". Sin embargo, puede definirse un nivel de estructuración superior del sistema denominado "metacuena"⁶⁷⁻⁶⁹. Las metacuencas son agrupaciones de cuencas separadas por pequeñas barreras de energía potencial. Con esta definición, se puede simplificar el estudio del PEL en metacuencas separadas por altas barreras de potencial (comparadas con las que separan las cuencas dentro de la metacuena).

Volviendo al estudio de la dinámica de relajación de vidrios y agua sobreenfriada, pueden identificarse dos procesos característicos denominados relajación α y β : la primera se relaciona con una importante reorganización estructural de largo alcance, que por su magnitud ocurren a tiempos largos; y la segunda corresponde a cambios menos significativos, de orden más bien local que ocurren a tiempos mucho más cortos. Resulta intuitivo entonces, relacionar como señalan nuestros resultados, los procesos de relajación α con transiciones entre metacuencas y los procesos de relajación β con movimiento entre cuencas⁶⁷⁻⁶⁹ (menor energía de activación).

Método de evaluación estructural (LSI)

El índice de estructura local (LSI) fue desarrollado por Shiratani y Sasai como una manera robusta de cuantificar el ordenamiento local de las moléculas de agua^{49,50}. Este indicador deriva de la observación de que ciertas moléculas de agua bien estructuradas, de baja densidad, presentan una brecha vacía entre los 3.2 y 3.8 Å en la distribución radial de sus vecinos; mientras que aquellas de peor estructura local suelen tener ocupado ese espacio con el consecuente aumento de la densidad local. La justificación de la brecha que se menciona anteriormente tiene sentido si se imagina un arreglo de tetraedros perfectos, apuntalado por los cuatro puentes de hidrógeno que puede formar la molécula

central. La irrupción de una quinta (o sexta) molécula en este espacio, tiende a distorsionar necesariamente el tetraedro de la molécula central, y probablemente, reordenar también la red de puentes de hidrógeno.

Para calcular el $LSI(i,t)$ para una molécula de agua i a tiempo t se debe ordenar el resto de las moléculas vecinas en función de su distancia radial r_j sobre i : $r_1 < r_2 < r_3 < \dots < r_{n(i,t)}$ donde $n(i,t)$ es elegido de modo que $r_{n(i,t)} < 3.7\text{\AA}$. finalmente el LSI es calculado como:

$$LSI(i,t) = \frac{1}{n(i,t)} \sum_{j=1}^{n(i,t)} [\Delta(j;i,t) - \bar{\Delta}(i,t)]^2$$

donde $\Delta(j;i,t) = r_{j+1} - r_j$ y $\bar{\Delta}(i,t)$ es el promedio de $\Delta(j;i,t)$ sobre todas las moléculas vecinas.

Entonces, un alto valor de $LSI(i,t)$ implica que la molécula i al tiempo t posee un alto orden tetraédrico local, mientras que valores cercanos a cero señalan un entorno defectuoso para esa molécula y por lo tanto una alta densidad local.

Como se ha mencionado, en este capítulo se evalúa el índice de estructura local sobre estructuras inherentes, con la finalidad de filtrar el ruido de las vibraciones térmicas de las moléculas y con esto, aumentar las posibilidades de identificar la estructura local apropiadamente⁷⁰.

Función de distribución radial ($G(r)$)

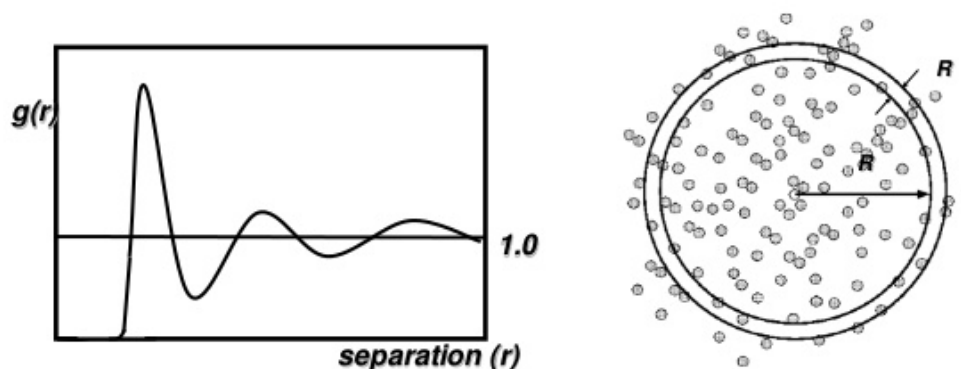


Figura 10: izquierda: gráfico de una distribución radial típica; derecha: esquema de muestreo radial.

En este capítulo y de aquí en adelante, recurriremos varias veces a la caracterización estructural del agua por medio de la llamada función de distribución radial (o función de correlación de pares) $G(r)$. Esta función representa la probabilidad de encontrar una determinada densidad de

partículas a una distancia " r " de una molécula central. La distribución se obtiene contabilizando el número de partículas a una distancia $r+dr$ y dividiendo por el volumen del casquete esférico para obtener la densidad. La densidad es finalmente normalizada para grandes distancias respecto a la densidad del agua bulk.

$$g(r) = \frac{dn(r)}{N 4\pi r^2 dr \rho}$$

Para calcular la $g(r)$ del agua suele medirse la distancia entre los centros de los átomos de oxígeno.

Más allá de la información estructural que brinda esta función, nos interesa también su correspondencia con la descripción termodinámica del potencial de fuerza media (PMF) que discutiremos más adelante.

$$PMF = -kT \ln g(r) + C$$

Evaluación de dinámicas de relajación

Otra de las contribuciones originales de nuestro equipo de investigación en la temática del capítulo, es el monitoreo de la evolución de la dinámica de relajación del agua sobreenfriada a partir de la llamada *matriz de distancia* $\Delta^2(t', t'')$ ^{67,71}. Cada elemento de la matriz está definido de la siguiente manera:

$$\Delta^2(t', t'') = N^{-1} \sum_{i=1}^N |r_i(t') - r_i(t'')|^2$$

donde $r_i(t)$ es la posición del oxígeno de la molécula i al tiempo t en la estructura inherente (aunque el uso de estructuras inherentes no es absolutamente necesario puesto que los resultados son comparables con los obtenidos en dinámicas reales). Entonces, $\Delta^2(t', t'')$ nos da el desplazamiento cuadrático promedio de una molécula en el intervalo de tiempo que va desde t' a t'' para todas las partículas (N). Por lo tanto cada elemento de la matriz depende de los tiempos elegidos. Es evidente entonces, que eligiendo el tiempo total de observación (del orden del tiempo de relajación α) y el intervalo de tiempo (cortos respecto a la relajación α), este método es particularmente eficiente para la observación de metacuencas.

El estudio de matrices de distancia sirvió a las investigaciones conducidas por nuestro grupo, para demostrar la existencia de movimientos "democráticos" de relajación estructural, caracterizados por la transición entre metacuencas concertada por grupos de varias moléculas. Este tipo de transición visible en gráficos de la matriz de distancia como el que mostraremos más adelante, requiere el estudio de sistemas relativamente pequeños (o pequeñas regiones de sistemas grandes), para evitar diluir el acontecimiento en el promedio con todas las moléculas.

Metodología

En este trabajo se realizaron dinámicas moleculares de dos modelos distintos de agua (discutidos en la introducción de esta tesis): TIP5P y SPC/E. En Ambos casos las estructuras obtenidas fueron derivadas a un proceso de minimización de la energía potencial para obtener las correspondientes estructuras inherentes.

Las simulaciones para TIP5P fueron ejecutadas en GROMACS^{72,73} con 512 moléculas de agua en condiciones periódicas de contorno, el ensamble evaluado fue NpT. Las dinámicas para SPC/E fueron evaluadas en NVE con condiciones periódicas de contorno usando la suite informática AMBER⁷⁴.

Los cálculos de LSI, matriz de distancia y distribución radial, entre otros, fueron realizados utilizando algoritmos propios desarrollados en FORTRAN.

Resultados

Resultados de LSI en estructuras inherentes

En la figura 11 se muestran las distribuciones de LSI obtenidas tanto para el modelo TIP5P (izquierda) como para SPC/E (derecha) a diferentes temperaturas. En ambos casos se observan distribuciones bimodales en el régimen de estructuras inherentes. El pico de la izquierda en ambas figuras corresponde a la fracción desestructurada (de alta densidad), cuya probabilidad disminuye a medida que disminuye la temperatura; de manera inversa, puede

verse que el pico correspondiente a moléculas bien estructuradas (derecha), tiende a despoblarse conforme al aumento de temperatura. Por último, existe un punto de mínima probabilidad, que permanece invariable con la temperatura (isosbético), ubicado en ambos sistemas a aproximadamente 0.14 \AA^2 .

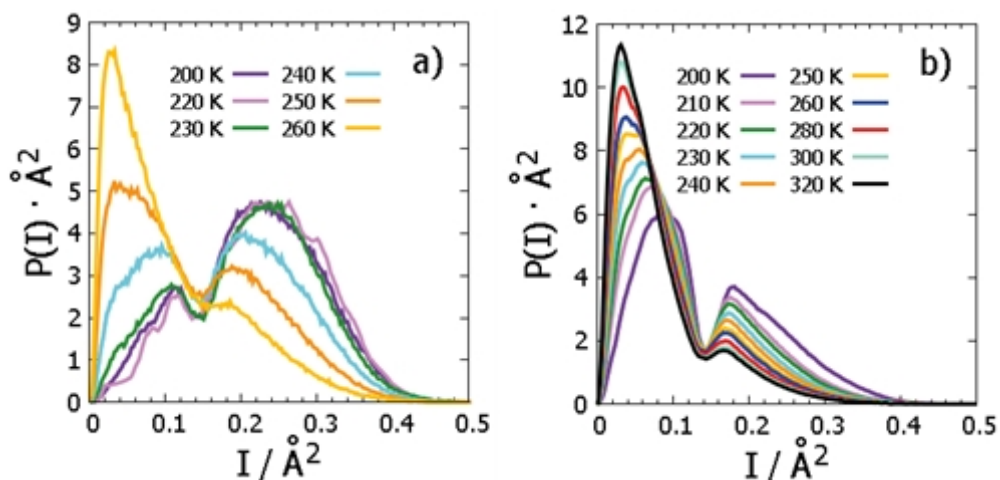


Figura 11: distribución de probabilidad de LSI; izquierda: para el modelo TIP5P; derecha: para el modelo SPC/E.

Una diferencia notable entre los modelos de agua aquí considerados es el régimen de temperaturas dentro del cual se produce este comportamiento multiestado: como puede observarse, SPC/E presenta bimodalidad a temperaturas correspondientes al líquido normal ($T_f=214\text{K}$), mientras que en el modelo TIP5P el pico bien estructurado comienza a desaparecer a temperaturas cercanas al punto de fusión ($T_f=271\text{K}$). Este hecho resulta bastante sorprendente, puesto que el modelado de TIP5P fue desarrollado justamente para representar con mayor precisión la capacidad del agua de formar estructura local tetraédrica. Sin embargo, ya se han reportado algunas fallas de comportamiento para TIP5P a altas temperaturas⁷⁵.

De hecho, el comportamiento observado en agua SPC/E se corresponde precisamente, no solo con lo reportado para otros modelos como TIP4P-2005, sino con experimentos realizados por rayos X, en los que se describe una relación de tres a uno para moléculas estructuradas a temperatura ambiente⁷⁶. Otra desviación en el comportamiento de TIP5P respecto tanto a lo observado en SPC/E como en otros modelos estudiados (TIP4P-2005⁷⁶, TIP4P-ice^{65,66} y modelos *ab initio*⁶⁶) es la respuesta del pico de alta estructura al aumento de temperatura. No solo se aprecia un pico mucho más ensanchado respecto a SPC/E, sino que el máximo de probabilidad se desplaza hacia la izquierda a

medida que decrece la temperatura, esta conducta parecería indicar una variedad de arreglos para el mismo pico de buena estructura, lo que contradice lo propuesto por Russo y Tanaka⁷⁷ para el modelo de dos estados.

Detalles del entorno local para moléculas de alta y baja estructuración

La hipótesis central de la clasificación de las moléculas de agua según su índice de estructura local propuesta por Shiratani y Sasai, es la existencia de una brecha que separa las moléculas de la primera y la segunda esfera de coordinación para moléculas bien organizadas tetraédricamente. A fines de comprobar esta hipótesis, y de comprender un poco mejor las características estructurales de cada pico de la distribución de LSI, se clasificó primero cada molécula en intervalos de 0.04 \AA^2 y luego se calculó la función de distribución radial para cada categoría.

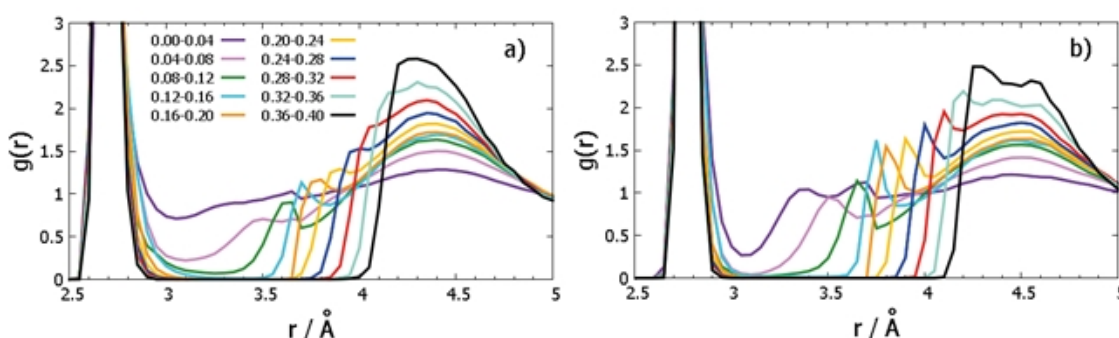


Figura 12: función de distribución radial O-O para moléculas de agua clasificadas según sus valores de LSI para: izquierda: el modelo TIP5P-Ew a $T=250\text{K}$; derecha: el modelo SPC/E a $T=210\text{K}$. El rango de de LSI en ambas figuras está dado en \AA^2 .

Como puede verse en las distribuciones radiales, para moléculas con un LSI mayor al mínimo ($0.12\text{-}0.16 \text{ \AA}^2$), la probabilidad de encontrar moléculas en la brecha que mencionábamos para el modelo de dos estados es nula. Sin embargo, cuando observamos el comportamiento de las moléculas desestructuradas, notamos que existe casi la misma probabilidad de encontrar moléculas entre $3 \text{ y } 3.5 \text{ \AA}$, como de encontrarlas a distancias mayores. Estas observaciones, equivalentes para los dos modelos de agua, corroboran la suposición establecida por Shiratani y Sasai.

Una característica que pudimos advertir de las conformaciones antes mencionadas es la reestructuración de la red de puentes de hidrógeno para moléculas de baja estructura. Una vez que una quinta vecina se aproxima al

tetraedro de coordinación, más allá de la ganancia en densidad, el nuevo ordenamiento puede justificarse por la formación de los llamados puentes de hidrógeno bifurcados, es decir, dos moléculas formando puentes de hidrógeno sobre un solo sitio disponible. Como cabe suponer, esto implica en general la formación de puentes de hidrógeno defectuosos (más débiles) con una geometría desplazada de las posiciones óptimas. De hecho, en este trabajo hemos cuantificado la capacidad de formar puentes de hidrógeno para cada clase de molécula, encontrando un 1% para moléculas de alto LSI y un 16% para moléculas de bajo LSI en agua TIP5; y un 3% contra 60% para sus equivalentes en agua SPC/E. Es importante aclarar, que para la detección de puentes de hidrógeno bifurcados se utilizó un criterio geométrico menos riguroso que al considerar puentes simples: distancia oxígeno-oxígeno 3.6 Å (en lugar de 3.5) y un ángulo O...H-O mayor a 110° (en lugar de 140°). Esta relajación de los criterios de corte geométrico es razonable, puesto que los puentes de hidrógeno bifurcados son un estado transitorio (metaestable) que disminuye la barrera de activación de la ruptura-formación de nuevas interacciones.

Para completar la caracterización del entorno de cada tipo de estructura, analizamos también las distribuciones de distancia para el cuarto y quinto vecino de la molécula central, utilizando el mismo intervalo de clasificación que en el estudio de la $g(r)$.

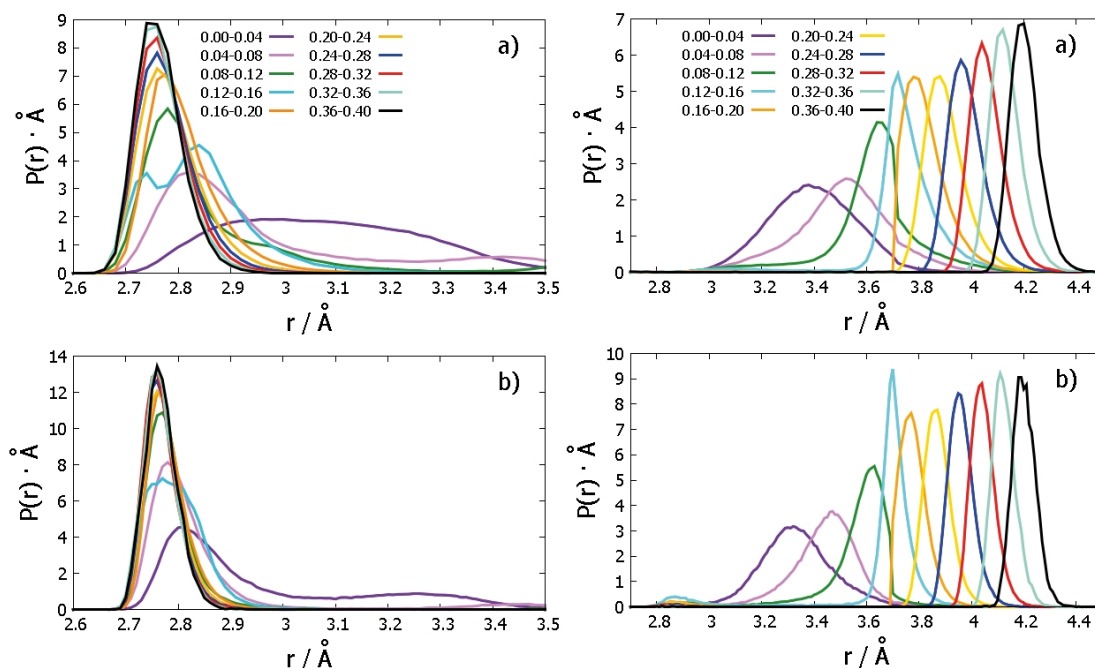


Figura 13: Izquierda: densidad de probabilidad $P(r)$ de encontrar el quinto vecino a la distancia " r ", para moléculas de agua clasificadas según su valor de LSI. Derecha: ídem anterior pero para el cuarto vecino. En ambos casos: arriba:TIP5P-Ew a 250K; SPC/E a 210K.

Como se muestra en las figuras, tanto en TIP5P como en SPC/E, puede notarse el desplazamiento (y el ensanchamiento) de los picos tanto del cuarto como del quinto vecino hacia la zona entre los 3 y los 3.5 Å, para moléculas con LSI menor que el mínimo. De hecho, puede verse como las distribuciones para el límite en LSI de 0.12-0.16 Å² se tornan asimétricas y caen muy abruptamente, antes de poblar la zona por debajo de los 3.6 Å.

Dependencia del índice de estructura local con la temperatura

Como mencionamos al comienzo de este capítulo, a medida que aumenta la temperatura aumenta la población de moléculas en el pico de baja estructura de la distribución de LSI, a expensas, por supuesto, de una disminución en el pico de alta estructura.

En esta sección, estudiaremos el comportamiento de las moléculas más representativas de cada pico (elegidas tomando un intervalo de LSI de 0.001 Å² a cada lado del máximo de cada pico y del valle intermedio), graficando la variación observada para cada distribución radial en función de la temperatura.

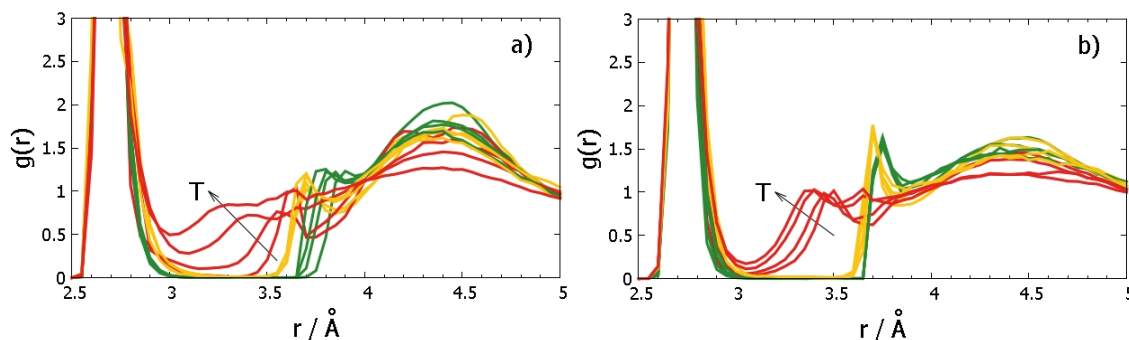


Figura 14: función de distribución radial oxígeno-oxígeno para moléculas al rededor de los picos: verde: de alta estructura (LSI-derecha $\pm 0.01\text{Å}^2$); rojo: de baja estructura local (LSI-izquierda $\pm 0.01\text{Å}^2$) y amarillo: punto isosbético. Izquierda: TIP5P-Ew; derecha SPC/E.

En el gráfico anterior, puede verse que el comportamiento del modelo de agua SPC/E se ajusta perfectamente a lo sugerido en el modelo de dos estados: las moléculas de alta estructura y pertenecientes al mínimo de la distribución son prácticamente insensibles a la temperatura (lo que implica que el orden estructural se mantiene), mientras que las moléculas desestructuradas, adoptan distintas conformaciones preferenciales dentro de su abanico de posibilidades.

Muy distinto es el caso de lo observado para TIP5P, para el que se corrobora lo supuesto al comienzo de este estudio: mientras que el mínimo permanece

invariable, tanto las moléculas desestructuradas como las estructuradas demuestran poseer una multiplicidad de arreglos disponibles.

Dependencia de la fracción de moléculas estructuradas con la temperatura.

Como se introdujo al comienzo del capítulo, el modelo de dos estados propuesto por Tanaka⁴⁸ se diferencia de otros modelos similares, por proponer un estado estabilizado por la formación de puentes de hidrógeno de buena calidad, y otro desestructurado, de alta entropía, que presenta una gran variedad de arreglos distintos y equivalentes. El modelo de Tanaka implica que la fracción de moléculas estructuradas en el sistema (ξ) debe seguir un peso de Boltzmann proporcional a la ganancia resultante de mejorar la estructura y el factor desestabilizante de incrementar el volumen local. Entonces, ξ debe presentar una dependencia exponencial con la recíproca de la temperatura absoluta. En la figura siguiente, se va a ilustrar este fenómeno, en términos de las temperaturas relativas ($T_r = T/T_f$), para comparar los modelos bajo un mismo régimen (pues difieren sus temperaturas de fusión).

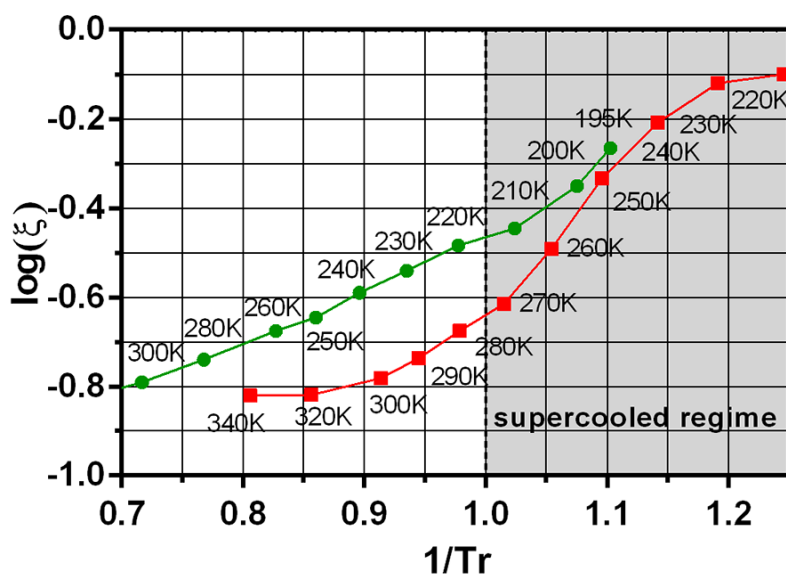


Figura 15: logaritmo de la fracción de moléculas estructuradas ξ en función de la recíproca de la temperatura reducida $1/T_r = T_m/T$ (siendo T_m la temperatura de fusión) para los modelos TIP5P (rojo) y SPC/E (verde).

Como puede observarse en la imagen, mientras que SPC/E sigue perfectamente una tendencia lineal consistente con el modelo de dos estados, este no es el caso para TIP5P, que tiende a subestimar ξ a altas temperaturas. Una prueba de que TIP5P no logra responder adecuadamente a lo observado

en experimentos⁷⁶, es que, a temperatura ambiente, se debería obtener una relación de 3 a 1 entre moléculas de alta y baja estructura, esto se cumple relativamente bien para SPC/E ($\xi=0.25$) pero es demasiado bajo para TIP5P ($\xi=0.15$).

Relación entre la dinámica de relajación vítrea y el pasaje de estructuras locales con alto y bajo LSI

Si bien es útil para construir un panorama general del comportamiento del agua estudiar la dinámica de interconversión de estructuras de alto y bajo LSI, no es la intención buscada en este capítulo (porque sobrepasa los alcances generales de esta tesis) ahondar en la descripción de dinámicas de relajación

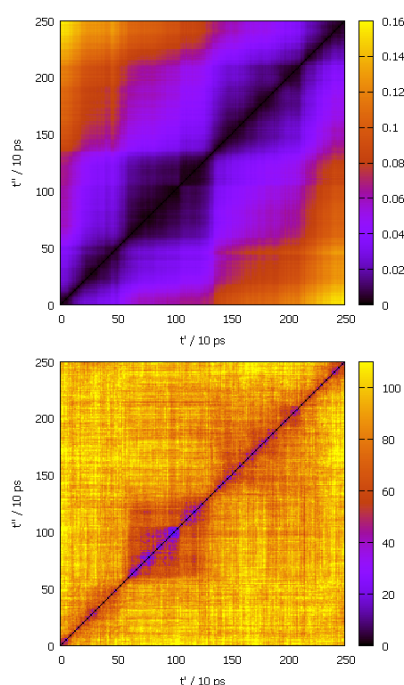


Figura 16: arriba: matriz de distancia típica obtenida para el modelo SPC/E a 210K; abajo: matriz de Hamming para la misma dinámica.

vítrea. Entonces, vamos a señalar los puntos de conexión entre dinámica y estructura, confiando las conclusiones a las que se arriba de acuerdo con experiencia de mi grupo de investigación en el tema.

En la figura se representa por un lado, la matriz de distancia para SPC/E a 210K que muestra un patrón característico de "islas" para líquidos sobreenfriados, este patrón se corresponde con por un proceso intermitente de relajación, en el que el sistema explora conformaciones equivalentes en el paisaje de energía potencial

(islas) y luego evoluciona abruptamente hasta una nueva situación similar.

En la misma figura, también se muestra una matriz de distancias de Hamming para las mismas condiciones representadas en (a). Esta matriz nos muestra cómo evoluciona la interconversión de moléculas de alto LSI a bajo LSI. Como puede observarse, en este gráfico también se evidencian zonas donde no hay demasiada transformación estructural (islas) y zonas donde el cambio es más abrupto. De hecho, se observa una muy buena correlación entre ambas matrices, lo que indica que el

sistema debe esperar los momentos de mayor movilidad, para realizar los cambios estructurales de mayor envergadura.

Conclusiones del capítulo

En este capítulo hemos estudiado los detalles del entorno local para moléculas de alta y baja densidad para los modelos de agua SPC/E y TIP5P. Pudimos observar un comportamiento similar en ambos modelos en el régimen sobreenfriado, consistente además con lo observado en otros modelos como TIP4P/2005, TIP4P-ice y modelos ab initio. Sin embargo, por encima de la temperatura de fusión el comportamiento de ambos modelos diverge, siendo especialmente notable la pérdida de estructura medida en TIP5P.

También se estudió la dependencia de la estructura local con el cambio de temperatura y, se pudo corroborar que el modelo SPC/E muestra un componente de alto LSI relativamente insensible a la temperatura, mientras que TIP5P presenta un pico ensanchado, cuyo máximo se desplaza en función de la temperatura. Esto parecería indicar que, mientras que el comportamiento de SPC/E se ajusta perfectamente a lo esperado según el modelo de dos estados, TIP5P presenta una variedad de subestructuras locales de alto LSI. Además, se probó que TIP5P tampoco sigue la tendencia lineal determinada por el peso de Boltzmann, desviándose notablemente de lo esperable a altas temperaturas (esto en realidad, prueba que TIP5P falla en la descripción del comportamiento real del agua, pues se contradice con lo medido experimentalmente por rayos X)

Finalmente, pudimos establecer para SPC/E, una conexión entre la dinámica de relajación vítrea y las fluctuaciones estructurales del sistema estudiado.

Capítulo 3

Agua nano confinada y superficial

Introducción

En el presente capítulo se intentará hacer un repaso de las características más relevantes para el marco de este trabajo de tesis, respecto del comportamiento del agua bajo condiciones de confinamiento nano y sub-nanométrico, como, así también en superficies con distintas propiedades fisicoquímicas. Se presentaran también, dos casos de estudio de relevancia, donde se ponen de manifiesto algunas de las cualidades que más tarde intentaremos explorar al explorar interacciones no covalentes en confinamiento.

La relevancia del estudio de las propiedades del agua de hidratación en los contextos de confinamiento y superficie, pueden no ser del todo obvia en este capítulo, pero, más adentrados en el cuerpo de la tesis, podremos entender que las particularidades de su comportamiento en sistemas química y estructuralmente complejos como las proteínas, terminan rigiendo sus capacidades de interacción. La realidad es que existen muchísimos sistemas químicos en medio acuoso más allá de los biológicos. Es así que existe una tendencia a nivel global que pretende extender la química sintética desarrollada en solventes más saludables para el medio ambiente.

Como hemos mencionado brevemente en el capítulo introductorio, el agua confinada posee propiedades (sobre todo) termodinámicas que distan mucho de lo esperable en el líquido puro. Además, dada la enorme experiencia científica y cotidiana sobre el comportamiento del agua derivado de sus propiedades macroscópicas, se ha formado una especie de sentido común al respecto que, la mayor parte de las veces, resulta en una mala interpretación de los fenómenos de hidratación a escala microscópica.

Como exploraremos a lo largo del capítulo, pese a la vasta bibliografía que ya existe en el tema, hay muchas cuestiones que siguen siendo objeto de debate dentro de la comunidad científica. Uno de esos temas que, al menos en parte, trataremos de abordar en la primera parte de este apartado, es la escala

dimensional en la que se puede distinguir entre fenómenos de superficie respecto a aquellos macroscópicos (o promedio). Al hablar de efectos de confinamiento, siempre surge la pregunta de si se puede tratar al agua como un medio continuo en fenómenos de hidratación o, en todo caso, a qué distancia deja de ser importante la influencia de la discretización molecular.

A lo largo de este capítulo, estudiaremos principalmente sistemas de química muy sencilla, tratando de aislar, en principio, las características fundamentales que rigen los cambios de conducta del agua en superficie para luego ahondar en la incidencia de la topografía (la geometría superficial) al respecto.

¿Qué es la hidrofobicidad?

Si bien mi opinión es que no se trata del enfoque más adecuado, cuando se habla de agua en superficie, en general, se está hablando de hidrofobicidad. Son las caras de una misma moneda: el agua se comporta distinto sobre superficies que en el bulk y este comportamiento puede utilizarse para caracterizar las superficies.

Muy básicamente, la hidrofobicidad de una superficie es una medida de su incapacidad para interactuar con el agua. Pero, como veremos más adelante, esto tampoco es una definición muy rigurosa y, mucho menos, sencilla de llevar a la práctica.

La incapacidad de una superficie para interactuar con el agua proviene de dos factores bien diferenciados: primero de la propia necesidad del agua de "saciar" sus cuatro posibilidades de puentes de hidrógeno, esto es un aspecto fundamental, puesto que en el agua pura, en estado líquido, esta es una necesidad satisfecha casi todo el tiempo y, segundo, de la interacción propiamente dicha que pueda establecerse entre el material y el agua. Sin embargo, ambos factores mencionados conllevan un alto grado de complejidad inherente, más allá de una combinación para nada trivial entre ambos.

Analicemos primero el caso de la red de puentes de hidrógeno. A excepción de los casos en los que el agua sea capaz de ordenarse para formar puentes de hidrógeno con la superficie (y ya esta primera excepción pone de manifiesto el grado de interconexión de los factores que afectan la hidrofobicidad), el número de puentes de hidrógeno por molécula superficial sería de, como máximo, tres (en una superficie completamente plana). Por supuesto, el hecho de perder uno

de los puentes de hidrógeno supone un costo entálpico de por sí alto, pero, además, es un costo difícil de pagar: el agua tiende a minimizar el número de moléculas expuestas a la superficie y, por lo tanto, tiene que "ordenarse"; es decir, disminuye su entropía. Es por este motivo que, más allá de tener que considerar la identidad química de una superficie para determinar su carácter hidrofóbico, también es necesario considerar su topografía (rugosidad, extensión, etc.). Por ejemplo, una superficie rugosa puede imponer restricciones de más de un puente de hidrógeno a las moléculas circundantes, acrecentando su carácter hidrofóbico.

Como se dijo anteriormente, por supuesto que las características químicas de una superficie juegan también un papel determinante en sus propiedades hidrofóbicas. En principio, una superficie con mayor capacidad de interactuar electrostáticamente con el agua es más hidrofílica; sin embargo, esto se ha malinterpretado en muchas ocasiones^{5,20,37,78-80}. El error más comúnmente cometido es el de utilizar los términos polar e hidrofílico o apolar e hidrofóbico como equivalentes, cuestión que, en principio, puede parecer correcta, pero que, una vez que reflexionamos sobre toda la suma de contribuciones a la hidrofobicidad, debería ser cada vez más sospechosa e invitar a la reflexión crítica.

Es verdad que, mientras mayor sea la capacidad de interactuar de la superficie con el agua, más fácil va a ser su competencia con la energía del puente de hidrógeno agua-agua que se va a perder; no obstante, no se debe olvidar que las interacciones dipolo-dipolo permanentes no son las únicas presentes en los sistemas fisicoquímicos. Más adelante demostraremos que, mientras que el grafeno es completamente apolar, las interacciones del tipo Van der Waals con el agua pueden alterar dramáticamente su hidrofobicidad. En este caso, es la densidad de interacciones de VdW y no su fuerza lo que termina modificando el panorama.

Por otra parte, es muy difícil establecer criterios que permitan clasificar inequívocamente superficies en polares o no polares, dado que, a menudo, se encuentran más bien regiones o "parches" de mayor o menor polaridad. Si bien este es un tema que se está abordando sistemáticamente, tanto en este grupo de investigación como en muchos otros, el criterio clave parece ser el de

evaluar las cualidades del agua en contacto con la superficie y no ya las propiedades fisicoquímicas de la misma.

Aunque se han planteado medidas tanto dinámicas como estructurales y termodinámicas para cuantificar el grado de hidrofobicidad de una superficie¹⁴, una muy interesante consiste en el cálculo de las fluctuaciones en la densidad local del agua¹⁴. En efecto, de aquí en más, este parámetro va a ser el más utilizado para cuantificar hidrofobicidad a lo largo de toda la tesis.

Se ha demostrado que la simple medida de la densidad del agua no representa una medida confiable de hidrofobicidad, lo cual es relativamente esperable en términos del conocimiento habitual de que el agua "aborrece el vacío" y, por lo tanto, tiende a hidratar tanto superficies polares como no polares. En consecuencia, los perfiles de densidad de agua normal al plano superficial presentan similares tendencias para ambos casos. Sin embargo, a diferencia de las superficies hidrofílicas donde las moléculas de agua están fuertemente ligadas mediante interacciones atractivas, las superficies hidrofóbicas solo presentan uniones débiles con el agua y, en consecuencia, las moléculas de la capa de hidratación presentan menores tiempos de residencia que en el bulk y, obviamente, son más fáciles de remover.

Por lo tanto, las propiedades dinámicas de la capa de hidratación van a evidenciar una movilidad mucho mayor en superficies hidrofílicas que en hidrofóbicas, una mayor compresibilidad y por lo tanto, una exacerbación de las fluctuaciones de la densidad local³⁵.

En el trabajo del equipo del profesor Garde^{14,35} se han caracterizado fluctuaciones de densidad en diferentes monocapas autoensambladas (SAMs) funcionalizadas superficialmente, verificando que aquellas superficies de naturaleza mayormente hidrofóbica (comprobada experimentalmente), presentan un incremento en las fluctuaciones respecto a las probadamente hidrofílicas, validando así el método propuesto.

La fluctuación en la densidad numérica de moléculas de agua (σ^2) en un volumen de observación pequeño e inmóvil, dividida por el número medio de moléculas en dicho volumen al cuadrado (\bar{N}^2), es aproximadamente igual a $kT/2\mu^{\text{ex}}$, donde μ^{ex} es el exceso de energía libre involucrado en la formación de una cavidad del tamaño del volumen de muestreo. Así, un elevado valor de σ^2/\bar{N}^2 implica un trabajo favorable para la formación de una cavidad en ese sitio.

Otro parámetro que facilita la clasificación de superficies entre hidrofóbicas e hidrofílicas es el tiempo de residencia de las moléculas dentro de un determinado entorno local. El método más confiable para medir tiempos de residencia es a partir de la llama función de autocorrelación.

Esta función viene definida como:

$$C(t) = \frac{\langle R(0)R(t) \rangle}{\langle R(0) \rangle^2}$$

Donde $R(t)$ es la función de residencia definida como $R(t) = \sum_i R_i(t)$, siendo el índice i el número de moléculas que al tiempo $t=0$ se encuentran dentro del volumen esférico de prueba. Entonces $R_i(t)$ vale 1 si la molécula sigue dentro de ese volumen al tiempo t y 0 si ya no lo está. Se espera que, sobre superficies de alta hidrofobicidad, las moléculas posean una dinámica exacerbada y, por lo tanto, su función de correlación decaiga más rápidamente.

Hidrofobicidad y geometría: agua en superficies con curvatura y poros.⁸¹

Como hemos señalado, el estudio de la hidrofobicidad local en superficies realísticas (como proteínas) viene definido por varios factores, en principio, geométricos y químicos. En este apartado se estudiará el efecto de la curvatura y rugosidad superficial, y las características de penetración del agua en poros o canales de distintos tamaños.

Una de las motivaciones principales para incluir el efecto de la curvatura en este trabajo de tesis, es la presencia de cavidades o "bolsillos" hidrofóbicos en sitios para la unión y el reconocimiento en proteínas. Se ha demostrado^{33,82}, que estos sitios inducen geoméricamente la deshidratación local del sitio de unión, lo que disminuye la energía libre necesaria para el binding.

La relación que existe entre hidratación y geometría ya ha sido ilustrada en trabajos recientes^{10,14,17,82-84}. En los que se ha demostrado; por ejemplo, que, mientras que el agua no es capaz de penetrar en cavidades sub-nanométricas talladas en superficies no polares, si puede atravesar aquellas con diámetros mayores al nanómetro. Este último comportamiento, como puede suponerse luego de lo introducido al comienzo del capítulo, se debe a la aprensión del agua a resignar puentes de hidrógeno con sus vecinas. En el caso de los

túneles del orden nanométrico, el espacio disponible permite retener la coordinación típica durante el proceso.

Metodología

En primer lugar se estudiaron sistemas tipo grafito, representados por monocapas de grafeno y nanotubos de carbono de capa simple con distintos radios. Dada la similitud química entre los sistemas, se va a considerar la placa de grafeno como análoga a un nanotubo de radio de curvatura infinito.

El modelo de la monocapa de grafeno fue construido en base a una estructura hexagonal perfecta de grafito de veinte anillos bencénicos finalizados en hidrógeno, dando un área superficial aproximada de 2300 \AA^2 . A su vez, los nanotubos de carbono se prepararon con una sola capa carbono de espesor arreglada en forma de zig-zag con dos radios distintos: 2 y 28 \AA respectivamente. La longitud de los tubos fue en ambos casos de 14 \AA .

Para los modelos de poros hidrofóbicos se crearon monocapas de 81 cadenas (de 9×9) de n-decano ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$) y monocapas de 144 cadenas (12×12) alineadas paralelamente para formar un cubo. Este arreglo espacial imita el arreglo de monocapas de ácido esteárico autoensambladas en agua, pero reemplazando las cabezas polares (COOH) por hidrógeno. En este caso, la placa autoensamblada (SAM) obtenida constituye simplemente un modelo hidrofóbico diseñado para el estudio del agua en su superficie, sin ninguna pretensión de representar propiedades específicas de ningún sistema real de interés. Nuestras cadenas tipo "alcano" fueron dispuestas en un arreglo cuadrado con separaciones entre cadenas de alrededor de 4.53 \AA (tomadas de la disposición natural de SAM de ácido esteárico), aunque también ensayamos modelos de SAM hexagonales (datos no mostrados) con resultados similares.

Los huecos se prepararon sobre la SAM inicialmente construida (perfect SAM), acortando la longitud de las cadenas centrales. La nomenclatura que utilizaremos para denominar los huecos se construye a partir de dos parámetros $A \times B$: siendo "A" el radio del hueco y "B" la profundidad en unidades metilénicas recortadas (así, una placa de hueco 1×1 indicaría un radio de 4.25 \AA y una profundidad igual a $1 \times 1.2 \text{ \AA}$, siendo 1.2 \AA la longitud de la unidad monomérica CH_2). Todos los huecos fueron cavados en el centro de las placas,

suficientemente lejos como para evitar los efectos del borde de la misma. La tabla siguiente muestra el resumen de todos los poros testeados.

SAM	Hole width (Å)	Hole depth (Å)
1 × 5	8.5	6.4
4 × 5	12.7	6.4
9 × 5	16.5	6.4
16 × 5	21.3	6.4
25 × 5	25.1	6.4
36 × 5	29.5	6.4
49 × 5	33.8	6.4
64 × 5	38.0	6.4

Tabla 2: descripción de los sistemas estudiados. Primera columna: tamaño del hueco en unidades CH₂; segunda columna: ancho del hueco; tercera columna: profundidad del hueco.

En todos los sistemas aquí mostrados se siguió protocolos casi idénticos de dinámica molecular. El modelo de agua utilizado en todos los casos fue TIP3P⁸⁵, en cajas de solvatación cubicas ortogonales, extendidas por lo menos a 20 Å del átomo pesado más cercano, utilizando condiciones periódicas de contorno. Todas las simulaciones se llevaron a cabo con la suite "AMBER10 molecular simulation"⁸⁵, con pasos de simulación de 2fs utilizando las parametrizaciones procedentes de los campos de fuerza FF99SB y GAFF para todas las moléculas. Las equilibraciones fueron ejecutadas bajo el ensamble NVE con termostato de Berendsen y luego en NPT con termostato de Langevin (lo mismo para las dinámicas de recolección de datos). Todas las simulaciones fueron conducidas a 300K y presión de 1 bar (excepto cuando se mencione explícitamente lo contrario), dando una densidad media de 1.0Kg/dm³. Las interacciones electrostáticas de corto alcance se modelaron según el método de las sumas de Ewald (PME)⁸⁶ con un cut-off de 8 Å.

Resultados

Orientación del agua superficial

Trabajos previos realizados por nuestro grupo sobre la orientación preferencial de las moléculas de agua al rededor de superficies tipo grafito, han demostrado que las primeras capas de agua sobre la superficie se arreglan en una estructura similar a la del hielo hexagonal (IceIh)⁸⁷⁻⁸⁹. Entonces, el agua en

estas condiciones prefiere orientar uno de los vértices del tetraedro hacia la superficie, lo que resulta sospechoso si se piensa la superficie gráfrica como hidrofóbica, dado que ocurre exactamente lo opuesto en la interfase agua-aire (donde la orientación más estable es con un átomo de hidrógeno apuntando hacia la superficie)^{87,90}.

En la siguiente figura se presentara un gráfico de distribución de orientaciones para moléculas de agua correspondientes al primer pico de densidad de la $g(r)$ tanto para grafeno, como para una SAM sin huecos y para la superficie exterior de un nanotubo de carbono de diámetro pequeño. Vamos a representar la probabilidad de hallar moléculas con un determinado $\cos(\theta)$ donde θ es el ángulo formado entre el enlace O-H del agua y la normal de la superficie. Esta medida resulta particularmente interesante, porque puede ser comparada con los resultados obtenidos experimentalmente por medio de espectroscopia

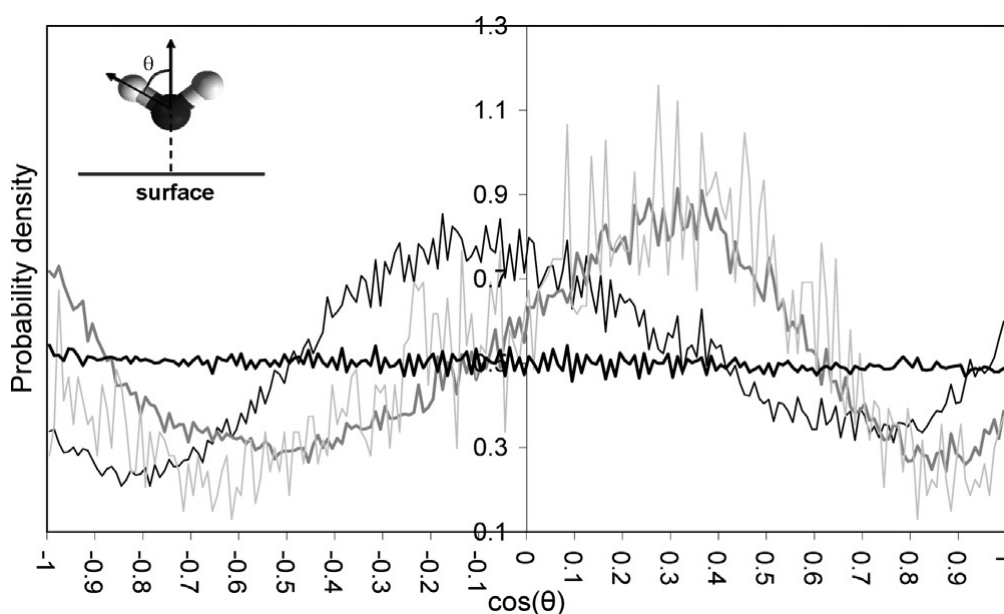


Figura 17: distribución del $\cos\theta$ para moléculas de agua cercanas a la superficie de grafeno (gris claro), del nanotubo de carbono de 2.0Å de radio (gris oscuro), una SAM plana (línea negra fina) y agua bulk (línea negra gruesa). Todos los resultados fueron obtenidos a $T=240K$. Para la placa de grafeno y la SAM el ángulo θ se define entre el enlace OH del agua y la normal de la superficie, mientras que para el tubo de carbono en lugar de la normal se toma una línea perpendicular al eje del cilindro.

vibracional⁸⁷.

En la figura se puede apreciar que las moléculas de agua cercanas a las superficies gráficas poseen un claro ordenamiento preferencial (a diferencia del agua bulk). La distribución de probabilidad para esas moléculas muestra un pico que corresponde a un ángulo de 70° con la superficie, esto es, tienden a

orientar hacia la superficie uno de los pares de electrones libres en el oxígeno. Como se mencionó anteriormente, esta conformación es compatible con el plano basal del hielo hexagonal.

En la figura también se observa que la preferencia en el ángulo es un poco menor para el nanotubo de carbono, probablemente debido a que su pequeño diámetro no distorsiona demasiado la red de puentes hidrógeno existente para las moléculas de agua vecinas.

Finalmente, se encontraron diferencias en el comportamiento observado para moléculas de agua en contacto con la superficie auto ensamblada, las cuales también poseen una orientación preferencial pero aproximadamente a 110° , lo que corresponde a orientar una de las caras del tetraedro de agua en lugar de uno de los vértices.

De manera análoga a lo calculado anteriormente, en la siguiente figura se muestra una distribución de probabilidad para $\cos(\theta_{dp})$ donde θ_{dp} en este caso, corresponde al ángulo formado entre el vector dipolar del agua y la normal de la superficie estudiada.

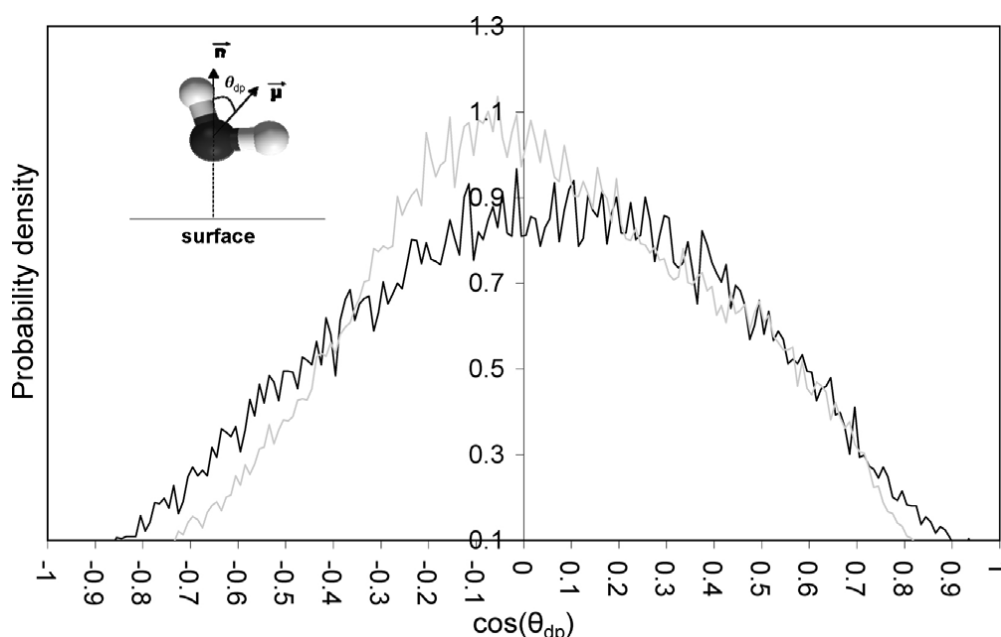


Figura 18: distribución del coseno del ángulo θ_{dp} formado entre el vector dipolar de la molécula de agua y la normal de la superficie. Se muestra los resultados obtenidos sobre grafeno (gris) y sobre una placa autoensamblada (negro).

Los resultados expuestos para este nuevo cálculo están en absoluta concordancia con todo lo previamente expuesto y muestran una clara

tendencia del agua por alinear el dipolo paralelamente a la superficie en ambos casos estudiados.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo se observó que, al medir el índice de estructura local (LSI) para moléculas de agua próximas a superficies de grafeno, se obtenía una alta organización estructural y que esa organización era muy similar también en moléculas de agua en la superficie exterior de tubos de carbono de gran radio^{50,89,91}. Sin embargo, al analizar nanotubos de carbono de diámetro subnanométrico, se notó que ese orden tetraédrico se perdía y eso motivó a investigar si las razones estaban relacionadas con una diferencia en el carácter hidrofóbico de los mismos.

En la próxima figura se evalúa las probabilidad de encontrar N moléculas de agua, $p(N)$, dentro de un volumen esférico de prueba de radio 3.3 \AA (similar al radio de una molécula de metano), tangente a la superficie gráfica de interés. Cuanto más amplia sea la distribución mostrada, más grandes serán las fluctuaciones en la densidad local (σ^2 / \bar{N}^2).

En la misma figura (derecha) se mostraran también las funciones de auto correlación del agua en las mismas superficies, que indican el tiempo de residencia de una molécula de agua en la región ensayada. Para este cálculo se probaron volúmenes esféricos de radio 3.0 \AA , de manera similar a lo testeado para $p(N)$.

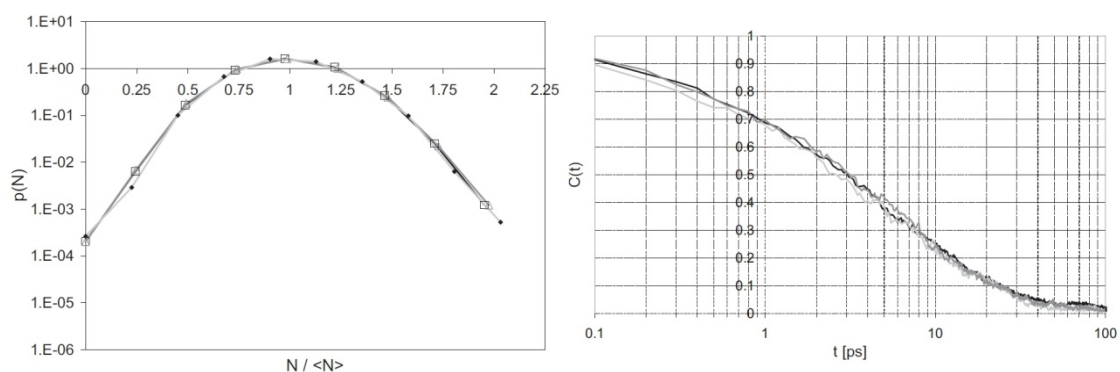


Figura 19: Izquierda: distribución de probabilidad $p(N)$ para una placa de grafeno (cuadrados) y para nanotubos de carbono de radio 2 \AA (triángulos) y 28 \AA (diamantes sólidos)

Del análisis de las figuras, puede inferirse que no existe un cambio apreciable en el grado de hidrofobicidad en superficies convexas al aumentar el radio de curvatura.

Hidrofobicidad de superficies de curvatura cóncava

Para estudiar el efecto de la concavidad sobre el carácter hidrofóbico de las superficies, se cavaron hoyos de distinto tamaño sobre las SAMs previamente descritas. Esta disposición geométrica resulta de particular interés, puesto que se encuentra ampliamente difundida entre sitios con mayor reactividad de las proteínas y en poros de materiales de gran atractivo en la industria química.

En este apartado evaluaremos las fluctuaciones en la densidad de agua normalizada (σ^2/\bar{N}^2), de la probabilidad de encontrar moléculas de agua en la "boca" de los huecos tallados en las monocapas. Esto significa que las esferas de observación se localizaran dentro del poro, de manera prácticamente tangencial a la línea definida por los átomos de hidrógeno que terminan las cadenas de alcanos de la monocapa. Adicionalmente, se estudiaron por comparación volúmenes de prueba centrados en el hoyo, pero tangentes a la superficie exterior de la monocapa.

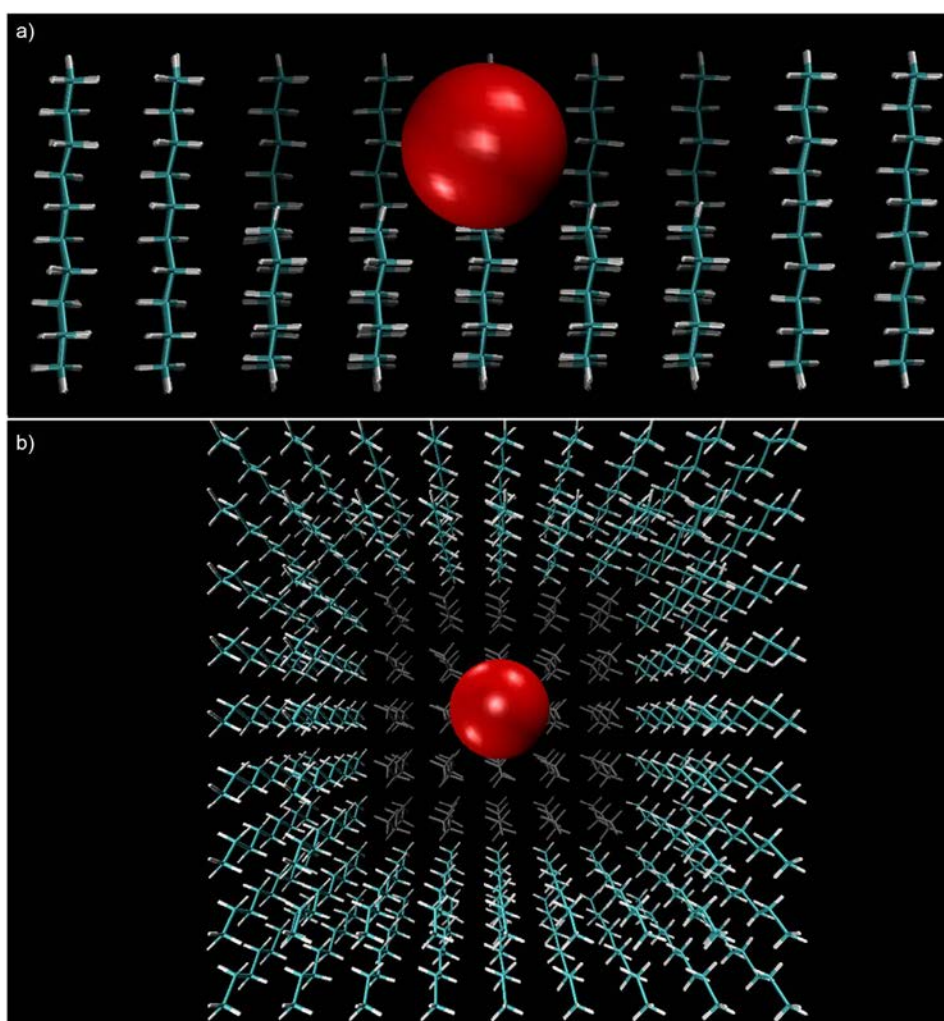


Figura 20: esquema de los huecos tallados sobre una SAM. La esfera roja señala el volumen de muestro utilizado.

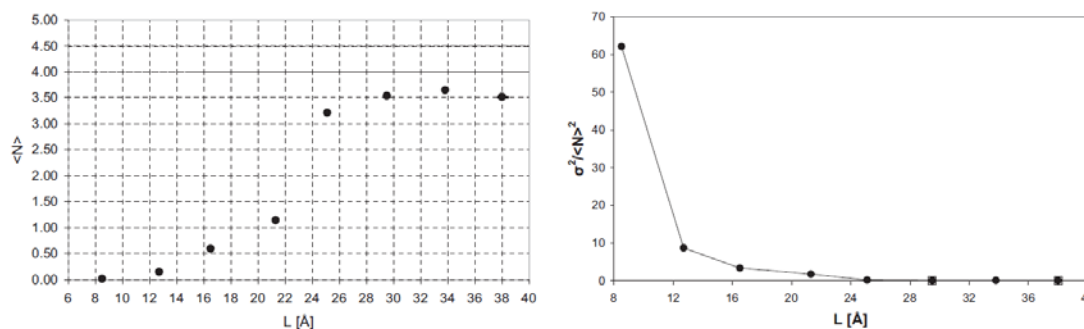


Figura 21: izquierda: número medio de moléculas de agua dentro del volumen de observación para SAMs con huecos, en función del tamaño del hueco (L). La línea punteada ($N \approx 4.5$) representa el valor medio para una placa perfecta (sin hueco). Derecha: fluctuaciones de densidad normalizada para SAMs en función del tamaño del hueco.

Más allá de las fluctuaciones de densidad de cada poro también se incluye lo obtenido para las monocapa perfecta (sin poro), donde la esfera de muestreo es colocada tangente a la superficie.

Del gráfico anterior queda muy claramente de manifiesto un fuerte incremento en la hidrofobicidad a medida que disminuye el tamaño del hueco. Es interesante notar que, más allá de observarse un incremento en la hidrofobicidad de todas las placas con huecos respecto a la placa perfecta, este efecto se torna especialmente importante para tamaños de poro sub nanométricos (las fluctuaciones de densidad crecen abruptamente).

Una particularidad interesante y relativamente inesperada observada en el gráfico de la izquierda (donde se muestra el número medio de moléculas de agua dentro de la cavidad) es la capacidad de promover la deshidratación local a partir de modificaciones en la curvatura. Esto se debe a que con diámetros de poro suficientemente pequeños, si bien el espacio alcanza para alojar agua en su interior, estas moléculas estarían absolutamente privadas de mantener su coordinación con las vecinas, significando esto un costo energético mayor al trabajo de dejar el hueco vacío.

Comportamiento hidrofílico en grafeno y superficies gráficas⁸⁰

Como hemos mencionado al principio, uno de los errores más frecuentes asociados con la caracterización de materiales por hidrofobicidad, es la creencia de que todo material no polar es hidrofóbico y todo aquel con propiedades polares se comporta hidrofílicamente. De hecho, existen en la bibliografía ejemplos que prueban la existencia de superficies polares con

marcado carácter hidrofóbico^{5,92}. En este apartado abordaremos el caso del comportamiento hidrofílico de superficies gráficas completamente apolares.

El caso del grafeno es paradigmático dado que históricamente ha sido catalogado como hidrofóbico tanto en enfoques teóricos como experimentales^{6,15,42,81,83,84,88,90,92-105}. Más aún, establecido cierto consenso en considerarlo como una superficie hidrofóbica prototípica⁶, se ha difundido su uso como modelo sobre el cual estudiar las características de hidratación hidrofóbica.

Sin embargo, algunas dudas también han surgido al respecto (véase por ejemplo ref.^{10,11,83,84,106-108}). En principio, se ha detectado que el agua muestra una sospechosa tendencia a penetrar nanotubos de carbono de pequeño diámetro, incluso contradiciendo su fobia a perder puentes de hidrógeno con sus vecinas. De hecho, se han visto moléculas de agua atravesando un tubo formando una estructura de puentes de hidrógeno lineal (perdiendo dos de los cuatro posibles). Dado que las moléculas de agua no son sensibles a la presencia de otras moléculas al otro lado de la pared del nanotubo, la única explicación plausible es considerar la posibilidad de interacción entre el agua y las paredes del material. Esto indicaría, al menos, que las superficies gráficas no son tan hidrofóbicas como se creía.

Otra prueba de la relevancia de la interacción del agua con las paredes gráficas proviene del campo de la simulación computacional. Se ha demostrado que es posible inducir la desorción de moléculas de agua dentro de nanotubos de carbono de pequeño diámetro, disminuyendo los parámetros de Lennard Jones del material^{10,83,103-105} (i.e. la intensidad de la interacción entre el agua y las paredes del tubo). De manera similar, desde nuestro grupo hemos comprobado que mientras que el agua puede penetrar en un nanotubo de carbono de 7Å de diámetro, el tamaño mínimo requerido para llenar túneles en SAMs hidrofóbicas es de aproximadamente dos veces ese diámetro⁸⁴. Lo anterior resulta de la necesidad de las moléculas agua de, en ausencia de interacciones con el material, penetrar dentro del tubo manteniendo parte de sus arreglo de puentes de hidrógeno.

Una de las razones históricas^{15,96-99} por las que se ha considerado siempre al grafeno como material prototípico del comportamiento hidrofóbico es la medición experimental del "ángulo de contacto" (o ángulo de gota), con valores

para el grafeno de alrededor de 90° (comportamiento clásicamente hidrofóbico). Sin embargo, un trabajo muy recientemente publicado¹⁰⁹ ha señalado la posibilidad de la contaminación del grafeno en aire (fundamentalmente con otros hidrocarburos en suspensión), provocando medidas erróneas del ángulo de contacto para grafeno; de hecho, sus medidas sobre grafeno pirolítico purificado arrojan valores de 64° (hidrofobicidad media) para la misma medida. Más aún, demostraron que el ángulo aumenta con el tiempo de exposición del material a la atmósfera, hasta alcanzar los valores cercanos a los 90° típicamente reportados.

En los apartados subsiguientes se demostrará, no solo el carácter hidrofílico del grafeno sino que también intentaremos cuantificar la magnitud de esa propiedad por medio de una variedad de medidas a partir del modelado computacional del sistema en agua.

Metodología

Para contabilizar la magnitud del carácter hidrofóbico del grafeno se diseñaron tres series de experimentos realizados a partir de dinámicas moleculares: primero exploraremos las dinámicas de autoensamblado de placas de grafeno liberadas desde distintas distancias en medio acuoso y compararemos lo observado con experimentos similares para SAMs hidrofóbicas modelo; dado que la experiencia anterior puede ilustrar muy bien las diferencias en las tendencias al colapso hidrofóbico pero no ofrece ninguna información sobre las condiciones de equilibrio, lo siguiente será la obtención de gráficos de potenciales de fuerza media (PMF), tanto en agua como en vacío, para grafeno y SAMs hidrofóbicas; finalmente, cuantificaremos la magnitud del carácter hidrofóbico del grafeno a partir de cálculos de fluctuaciones de densidad del agua de hidratación.

Para las dinámicas de autoensamblado se prepararon sistemas de dos placas de grafeno hexagonal perfecto enfrentadas, con medidas aproximadas de $20 \times 20 \text{ \AA}$ a dos distancias distintas: $D_1=5 \text{ \AA}$ y $D_2=7 \text{ \AA}$. Como comparación, se realizó el mismo procedimiento para SAMs hidrofóbicas de n-nonano de 25 cadenas (en un arreglo de 5×5). En este caso las simulaciones se empezaron a distancias iniciales entre las SAMs de: $d_1=7 \text{ \AA}$ y $d_2=12 \text{ \AA}$. Cabe aclarar que la

elección de las distancias iniciales en ambos casos, se basa en la observación de diámetros mínimos requeridos para la penetración de agua en nanotubos de carbono y en túneles tallados en SAMs hidrofóbicas.

Todas las dinámicas moleculares se llevaron a cabo siguiendo prácticamente los mismos protocolos descritos en el apartado "hidrofobicidad y geometría" de este mismo capítulo.

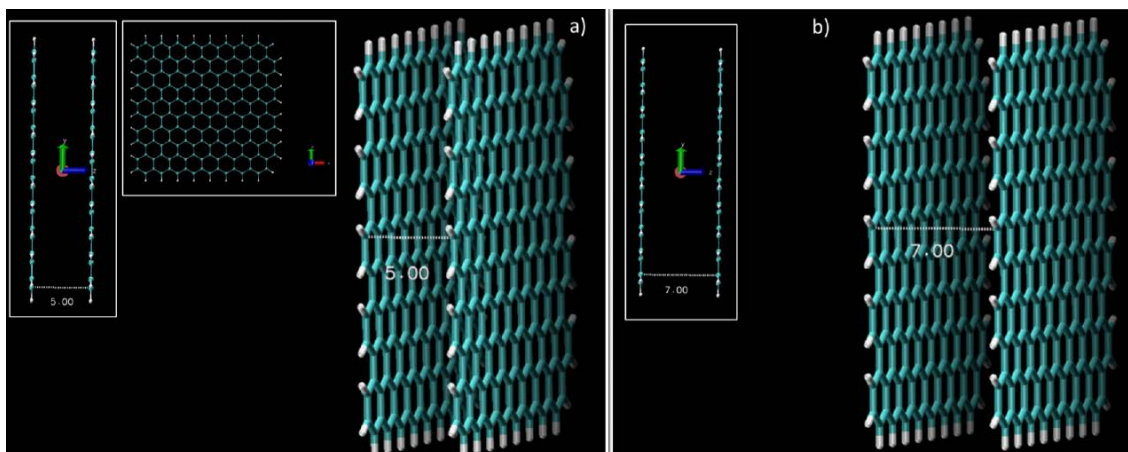


Figura 22: dos placas paralelas de grafeno a distancias iniciales $D_1 = 5 \text{ \AA}$ (izquierda) y $D_2 = 7 \text{ \AA}$ (derecha)

Para la obtención de los perfiles energéticos del potencial de fuerza media (PMF), se empleó la suite informática GROMACS5.1^{72,73}, utilizando el método de análisis de histogramas ponderados (WHAM¹⁰⁹) con muestreo de dinámicas sesgadas (umbrella sampling¹¹⁰⁻¹¹²). Se obtuvieron perfiles de energía libre en función de la distancia, tanto para el ensamblado de placas de grafeno, como de SAMs hidrofóbicas. Además de los PMF en medio acuoso, se realizaron los mismos experimentos para los sistemas en vacío, con el objetivo de evidenciar el grado exacto de incidencia del agua en la termodinámica de unión.

Finalmente, para el estudio de fluctuaciones de densidad se prepararon los siguientes sistemas:

- Una placa de grafeno de $50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$, solvatada con agua TIP3P utilizando los parámetros de Lennard-Jones predeterminados en el campo de fuerzas GAFF ($\sigma_{C-O} = 3.275 \text{ \AA}$, $\epsilon_{C-O} = 0.114 \text{ kcal/mol}$). También se realizó un estudio sobre este mismo sistema debilitando la intensidad de la interacción C-O a la mitad ($\epsilon'_{C-O} = 0.065 \text{ kcal/mol}$)¹⁰⁵.
- La misma placa de grafeno del punto anterior, con los parámetros estándar de GAFF, pero hidratada con el modelo de agua SPC/E.

- Una SAM de n-octano de 91 cadenas (arregladas 9x9) solvatada con agua TIP3P.
- Una SAM hidrofílica modelo, construida reemplazando un hidrógeno por un oxidrilo en las cabezas terminales de la placa del punto anterior (dando grupos superficiales $-\text{CH}_2\text{OH}$), hidratada también con el modelo TIP3P.

Resultados

Autoensamblado en medio acuoso

En los experimentos de autoensamblado, partiendo desde distintas separaciones iniciales entre placas de grafeno se observó lo siguiente:

Para las dinámicas en las que se prefijó la separación inicial de 5 \AA , no se encontraron moléculas de agua entre las placas luego de la equilibración (con las posiciones de los átomos de carbono restringidas por un potencial armónico). Esto es razonable, puesto lo que sabemos del perfil de densidad, que la primera molécula de agua se encuentra a unos $2.5\text{-}2.7 \text{ \AA}$ de la superficie. Una vez que se quitaron las restricciones de posición, durante la dinámica de colección de datos, las placas colapsaron en los primeros 5ps.

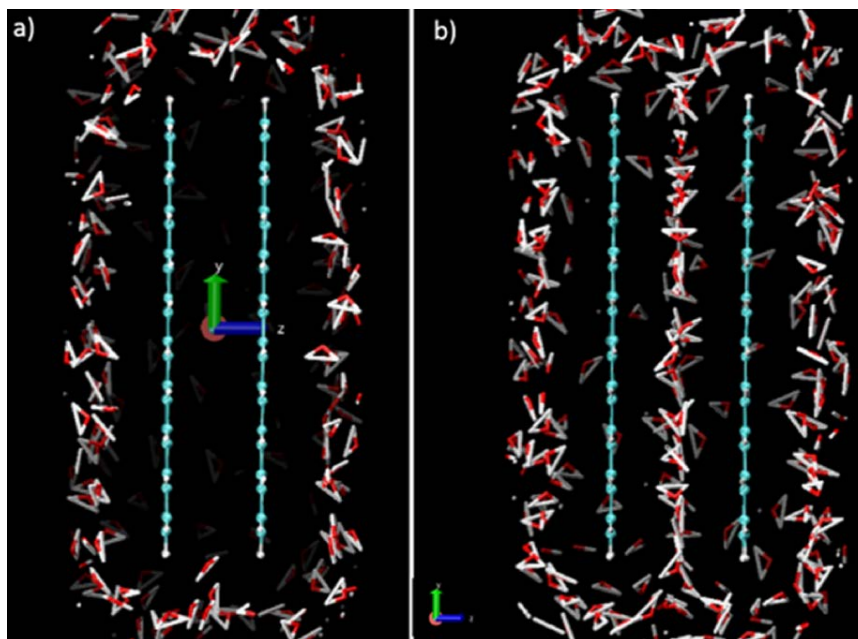


Figura 23: configuración final luego del equilibrado de los sistemas de grafeno. (a) Para una separación inicial $D_1 = 5 \text{ \AA}$, no se aprecia agua en la interfase. (b) Para una separación inicial $D_2 = 7 \text{ \AA}$, se puede observar una capa de agua entre las placas (el ensamblado no es completo)

La situación obtenida en el experimento con las placas separadas inicialmente 7 Å es completamente diferente, en este caso sí se observó una capa completa de hidratación entre las placas que permaneció durante toda la simulación. En este contexto, las placas de grafeno bien hidratadas no se ensamblaron en los 3 ns de las simulaciones de producción. Ya veremos en la sección de resultados arrojados por los perfiles de energía libre de unión que, si bien la situación de equilibrio es aquella con las placas ensambladas, existe para el grafeno una alta energía de activación para desplazar la última capa de agua (i.e. una cinética más lenta).

Finalmente, en concordancia con lo detallado en la literatura¹⁰³⁻¹⁰⁵, si se disminuyen las interacciones de L-J entre el agua y el carbono del grafeno a la mitad, no se observa agua en la interfase y las placas colapsan en los primeros 4ps de dinámica.

El mecanismo de ensamblado para SAMs hidrofóbicas en agua resultó ser muy distinto a lo descrito para el grafeno, especialmente al ensayar la distancia d_2 (12 Å). Lo más interesante del experimento separando las monocapas a 12 Å, es que, si bien se observó una buena penetración de agua en la región entre las SAMs, una vez apagados los potenciales armónicos, las placas lograron desplazar el agua y unirse en los primeros 100 ps de simulación.

Potenciales de fuerza media (PMF)

El potencial de fuerza media describe cómo cambia el perfil de energía libre como función de una coordenada de reacción específicamente escogida (en nuestro caso la distancia entre las placas). El PMF viene definido como $\Delta G_{PMF} = -k_B \cdot T \cdot \ln g(r)$ donde k_B es la constante de Boltzmann, T , la temperatura y $g(r)$ es la función de distribución radial del centro de masa de las placas.

En este apartado se describen los resultados obtenidos de calcular el PMF tanto en agua como en vacío, para la unión de dos placas de grafeno y dos monocapas autoensambladas (SAMs).

De los perfiles de energía obtenidos puede concluirse que, si bien ambos procesos de autoensamblado en agua son favorables (ΔG negativa), la contribución del agua en ambos casos es opuesta. En el caso del grafeno se observa que el agua actúa disminuyendo la energía de unión (efecto repulsivo),

mientras que en la SAM la energía de unión es más favorable en agua que en vacío (efecto atractivo). Justamente, el efecto atractivo del agua dio lugar al término "efecto hidrofóbico" que gobierna el autoensamblado de moléculas hidrofóbicas en agua.

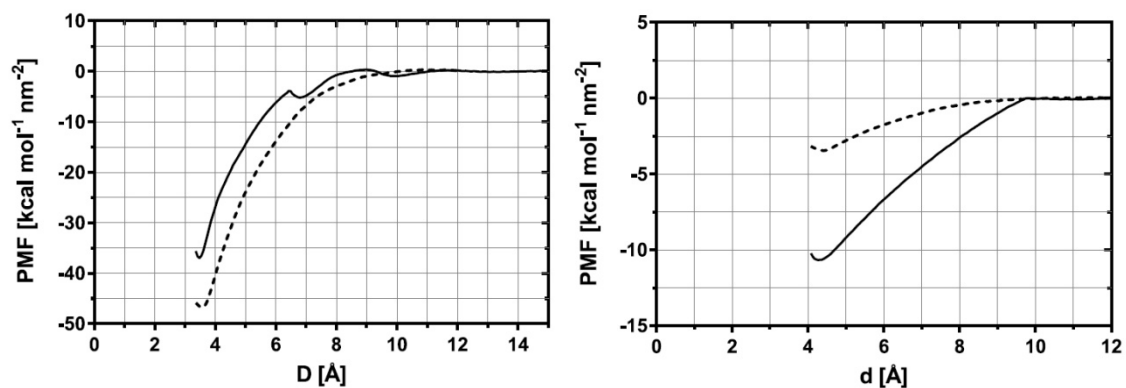


Figura 24: potencial de fuerza media para el ensamblado de dos placas de grafeno (izquierda) y dos SAMs hidrofóbicas (derecha). en ambos casos en línea completa se muestra el perfil de energía obtenido en agua y en línea punteada su equivalente en vacío.

Otra diferencia importante entre los paisajes de energía obtenidos para los dos sistemas es la presencia de dos mínimos locales en el PMF del grafeno que corresponden, justamente, a los estados hidratados con una y dos capas de agua respectivamente (ausentes para la SAM). Esta observación es

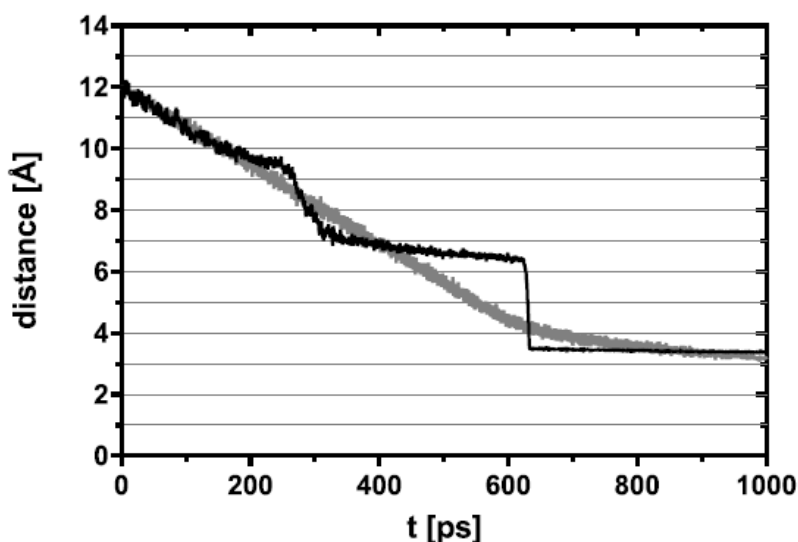


Figura 25: distancia observada entre las placas de grafeno (línea negra) y SAMs (línea gris) durante la dinámica de pulling.

compatible con lo mostrado en la figura 21, que posiciona las placas hidratadas a la distancia correspondiente al mínimo local (6.9 Å) lo que explica la dificultad del sistema para alcanzar el colapso en los tiempos de simulación ensayados. En la próxima figura se ilustra este mecanismo mediante una dinámica forzada

de unión en la que se ve la resistencia del grafeno a liberar esas dos últimas capas de hidratación.

Estudio de fluctuaciones de densidad

A continuación se muestran los resultados obtenidos al calcular las fluctuaciones de la densidad de agua de los sistemas detallados en la metodología. El protocolo por el cual fueron derivados y los principios a los que responden ya fueron explicados en la introducción del capítulo. Vale decir que el estudio de fluctuaciones de densidad para caracterizar las propiedades de materiales grafíticos todavía no había sido expresado en la literatura hasta el momento de realizada esta tesis.

En esta oportunidad, en lugar de expresar las fluctuaciones como (σ^2 / \bar{N}^2) , se presentara un gráfico de distribución de probabilidades de encontrar una cantidad de moléculas "N" en el volumen de muestreo, dividido por el valor medio $\langle N \rangle$ de la simulación.

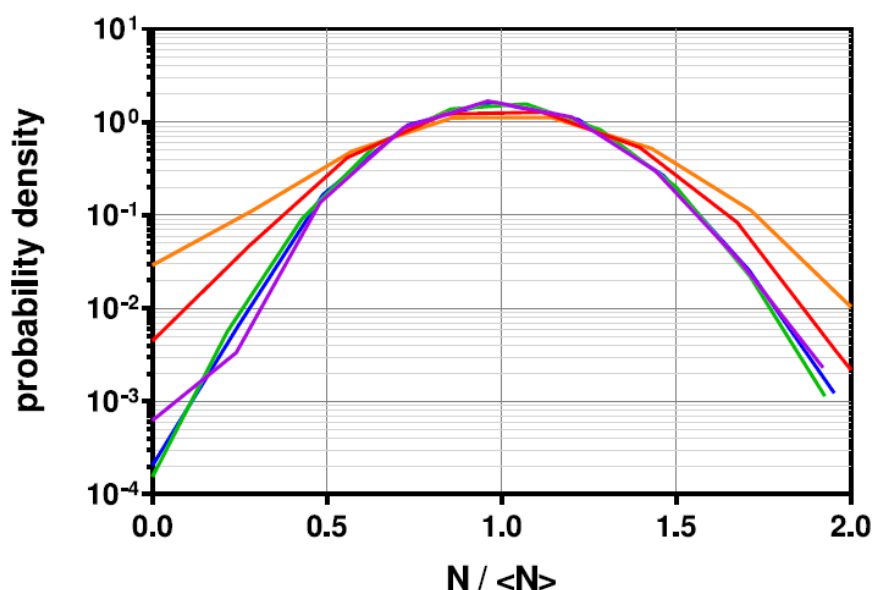


Figura 26: distribución de probabilidad de hallar "N" moléculas de agua en un volumen de muestreo esférico de 3.3 Å de diámetro tangente a las superficies estudiadas. Naranja: SAM con grupos terminales -CH₃. Verde: SAM terminada en grupos -OH. Azul: grafeno con parámetros de Lennard-Jones $\sigma_{CO} = 3.275 \text{ \AA}$ y $\epsilon_{CO} = 0.114 \text{ kcal/mol}$. Violeta: grafeno con parámetros de L-J $\sigma_{CO} = 3.41 \text{ \AA}$ y $\epsilon_{CO} = 0.065 \text{ kcal/mol}$.

Nos fijaremos en este caso, en la probabilidad de encontrar $N=0$ moléculas de agua (i.e. una cavidad) en la esfera de prueba. Mientras más alta resulte esta probabilidad, menor será el trabajo requerido para desplazar las moléculas de

agua, mayores las fluctuaciones de densidad y, por lo tanto, mayor el carácter hidrofóbico del sistema.

De este gráfico se puede deducir que, por un lado, el grafeno con los parámetros de L-J estándar se comporta de forma muy parecida a lo observado para la SAM hidrofílica (tanto en TIP3P como en SPC/E); pero, además, que una vez disminuidas artificialmente las interacciones entre el agua y los átomos de carbono, el grafeno aumenta su hidrofobicidad ($P(0)$ se incrementa), acercándose a lo observado para la SAM hidrofóbica.

Dado que el cálculo de fluctuaciones de densidad es relativamente nuevo y no completamente validado por la comunidad científica, a continuación se muestra un cálculo mucho más conservador para determinar hidrofobicidad, basado en las diferencias de compresibilidad del agua en superficie.

Perfiles de densidad de agua

Se ha indicado¹¹³ (particularmente bien detalladamente en la revisión realizada por Giovambattista y Debenedetti⁵) que los perfiles de densidad de agua en superficies hidrofílicas no cambia apreciablemente al variar la presión del sistema. Por el contrario, el cambio en la densidad sobre superficies hidrofóbicas es muy importante debido a la antes mencionada compresibilidad del agua en esas condiciones.

En la siguiente figura se muestran las distribuciones de densidad obtenidas tanto para SAMs hidrofílicas e hidrofóbicas como para grafeno con parámetros estándar de L-J y disminuidos; obtenidas a $P_1=1\text{bar}$ y $P_2=2\text{kbar}$. Para la cuantificación del carácter hidrofóbico nos vamos a centrar en el valor de la densidad obtenido a las dos presiones y calcularemos la relación $\phi=\delta_{P_2}/\delta_{P_1}$. Los sistemas hidrofóbicos presentarán entonces, los valores más altos de ϕ , que dan cuenta de un mayor factor de compresibilidad.

Como se puede ver en la figura 27, tanto la SAM hidrofílica ($\phi=1.10$) como el grafeno ($\phi=1.20$) son muy poco sensibles al cambio de presión, mientras que la SAM hidrofóbica ($\phi=1.35$) y el grafeno con interacciones apaciguadas ($\phi=1.30$) sufren modificaciones mucho más drásticas.

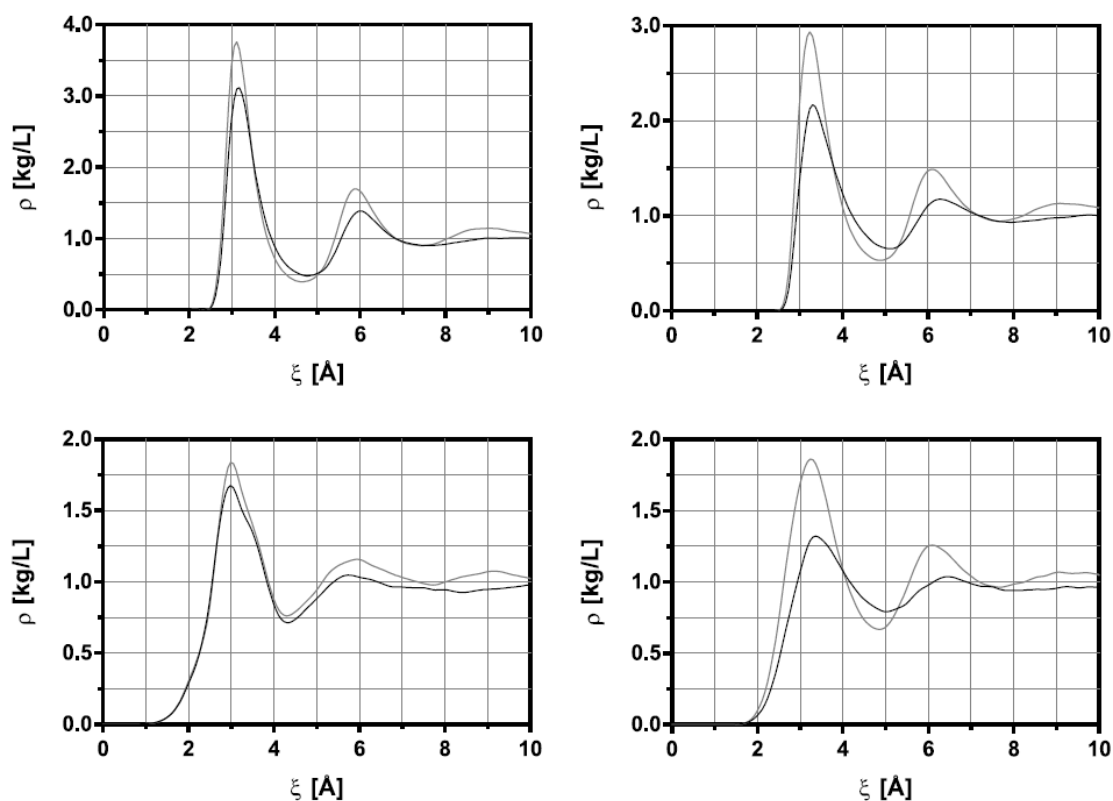


Figura 27: perfiles de densidad de agua TIP3P a $T = 300\text{K}$ en función de la distancia ξ desde las superficies de estudio. Arriba e izquierda: grafeno con parámetros de L-J típicos. Arriba y derecha: grafeno con parámetros de L-J modificados. Abajo e izquierda: SAM hidrofílica. Abajo y derecha: SAM hidrofóbica. En todos los casos se muestra con línea negra los resultados obtenidos a $P = 1$ bar y en gris $P = 2\text{kbar}$.

Todo lo expuesto anteriormente resulta en perfecta correspondencia con las conclusiones arribadas luego del análisis de fluctuaciones de densidad. Vale aclarar que, más allá del éxito en la cuantificación del carácter hidrofóbico de las superficies estudiadas, el método de las fluctuaciones de densidad es mucho más fácilmente aplicable puesto que requiere solo una dinámica molecular por sistema. En contraste, el protocolo para obtener los perfiles de densidad necesita de, al menos, dos simulaciones y fuera de las condiciones estándar (lo que muchas veces puede complicar su empleo).

Conclusiones del capítulo

La reflexión más importante que debe extraerse de la información mostrada a lo largo de este capítulo es el entendimiento de la complejidad que envuelve el concepto de hidrofobicidad. Hemos demostrado aquí que el carácter hidrofóbico de una superficie puede ser evidenciado solamente por el efecto

que causa sobre las moléculas de agua en su entorno. Si bien un estudio sistemático sobre la materia puede arrojar algunas regularidades entre el comportamiento del agua y la identidad fisicoquímica de la superficie, cada caso suele presentar sus particularidades.

En este capítulo hemos demostrado, por un lado, que la naturaleza química de las superficies puede ser engañosa respecto a su hidrofobicidad y, por otro lado, que la topología de esa superficie también interviene en el efecto sobre el agua circundante.

Específicamente en el análisis sobre el carácter hidrofóbico del grafeno demostramos que su naturaleza apolar no domina el efecto sobre el solvente dado que, pese a esta característica, muestra un comportamiento típicamente hidrofílico. Hemos señalado en este trabajo que, al menos en sistemas con elevada densidad atómica como el grafeno, las interacciones del tipo Van der Waals no pueden ser subestimadas.

Por último, a partir de un estudio sistemático de superficies con curvatura demostramos que, en cavidades de dimensiones subnanométricas, el efecto geométrico promueve la deshidratación local e incrementa el carácter hidrofóbico de dicha superficie.

En resumen, en este capítulo extendimos el repertorio de nociones a tener en cuenta antes de suponer el grado de hidrofobicidad de una superficie. Especialmente proponemos discontinuar, de aquí en adelante, la utilización de los términos polar e hidrofílico o apolar e hidrofóbico como sinónimos.

Capítulo 4

Interacciones electrostáticas en agua

Introducción

A lo largo de los capítulos precedentes nos hemos focalizado en los fenómenos que gobiernan el comportamiento del agua, tanto en superficies como en confinamiento. Hablamos del concepto clave de hidrofobicidad y cómo éste es afectado según las características químicas y morfológicas de la interfase. Sin embargo, el motivo de todo lo que se estudió anteriormente era construir las bases teóricas necesarias para poder abordar el tema primordial de esta tesis: interacciones electrostáticas en entornos fisicoquímicamente complejos.

Mirado en retrospectiva, el desarrollo de todo el proceso de conocimiento enmarcado en la tesis resultó en una cadena retroalimentada, pivotando sobre un eje desconocido, que balancea, por un lado la química de la naturaleza y, por el otro, el entendimiento científico de las leyes que gobiernan la misma. El objetivo original de este trabajo se centraba en comprender los mecanismos de unión y reconocimiento molecular en proteínas (focalizado en el diseño de drogas); sin embargo, mientras más analizábamos los procesos naturales, comenzamos a encontrar más y más huecos en el conocimiento teórico formal para describirlos. En este capítulo, trataremos de organizar todo lo aprendido y lo pondremos a prueba en sistemas modelo de complejidad controlada, pero fuertemente inspirados en lo observado en sistemas biológicos.

Como ya hemos mencionado en el marco teórico general, el agua tiene una profunda influencia sobre las interacciones electrostáticas que en ella ocurren. En principio; por ejemplo, dada su elevada constante dieléctrica, se podría pensar que cualquier interacción coulombica debería ser trivial en agua. La realidad, es que casi todos los modos de unión entre proteínas, involucran al menos algún tipo de interacción electrostática específica. Mucho se ha escrito sobre la importancia del efecto hidrofóbico en el autoensamblado de macromoléculas de origen biológico¹¹⁴⁻¹¹⁸, y, aunque ciertamente la interacción hidrofóbica no debe ser menospreciada, se ha conjeturado ya (ver, por

ejemplo, teoría del "O-ring" de Bogan²¹ y similares^{22,23}) que las porciones más hidrofóbicas de la superficie, pueden no necesariamente estar contribuyendo de manera directa al binding, sino más bien, "adecuando" el entorno, de manera que el resto de las interacciones cobren relevancia.

En términos termodinámicos puros, la energía libre de unión entre dos partículas en un medio cualquiera, viene dada por la diferencia entre la energía del complejo formado y la energía de las moléculas aisladas en el disolvente. En otras palabras, se puede pensar simplifícadamente como la diferencia entre las interacciones entre las moléculas del complejo, menos la energía de interacción entre la molécula y el solvente (en este caso no estamos teniendo en cuenta el efecto entrópico que pueda tener el ensamble molecular). Dicho esto, es sencillo llegar a la conclusión (al menos teórica), de que se pueden mejorar las energías libres de unión, bien aumentando la fuerza de las interacciones entre las moléculas, o bien disminuyendo la interacción entre las moléculas y el solvente.

En el caso de interacciones en agua, podemos traducir lo anteriormente mencionado de la siguiente manera: para maximizar la eficiencia de las interacciones en agua, se podría, por un lado, mejorar la naturaleza de las interacciones entre las moléculas del complejo (ya veremos, por ejemplo, disminuyendo la constante dieléctrica local) y por el otro, disminuyendo las interacciones agua-interfase, o, lo que es equivalente, aumentando la facilidad de remoción de estas moléculas de agua del sitio de unión.

Como se ve, ambas posibilidades mantienen una estrecha relación con lo que hemos venido estudiando a lo largo de los capítulos previos. Como sabemos, la elevada constante dieléctrica del agua se relaciona con la capacidad de alinearse con el campo eléctrico y, por consiguiente, con la capacidad establecer conexiones de puente de hidrógeno con moléculas vecinas. Así, todo lo aprendido de la relación entre hidrofobicidad y ordenamiento, factores estructurales del agua, diferencias en el comportamiento superficial, etc.; ahora vemos que puede ser la piedra roseta, que nos permita interpretar cómo pueden modularse interacciones electrostáticas en agua a partir de pequeñas variaciones en el entorno.

Además de las relaciones entre las propiedades estructurales en agua y las características de los materiales en las que se la confina, en el capítulo anterior

también observamos que es posible modificar la afinidad del agua por algunos sitios en superficie alterando las condiciones fisicoquímicas del mismo. Por ejemplo, observamos que es posible inducir la deshidratación local de un sitio modificando la curvatura superficial. Es decir, ya en capítulos anteriores forjamos las herramientas que permiten el manejo de las interacciones entre el agua y las superficies que se van a unir.

Una aclaración pertinente a esta altura, es que, como se explicó previamente, el carácter hidrofóbico de las superficies por supuesto depende, más allá de las propiedades topográficas de las superficies que hemos estudiado, de su identidad química. Este factor no ha sido explorado en esta tesis, debido a que ya ha sido extensamente discutido en las tesis doctorales del grupo de investigación al que pertenezco (véanse las tesis doctorales de Sebastián Accordino, David Malaspina, etc.). Sin embargo, la dependencia entre hidrofobicidad y química va a ser igualmente explotada en el transcurso de este capítulo. En última instancia, es el carácter hidrofóbico de las superficies y no sus razones, lo que termina influenciando el comportamiento del agua en confinamiento.

El entendimiento de las relaciones entre hidrofobicidad e interacciones no covalentes sigue siendo una materia pendiente en el esfuerzo de la comunidad científica. Hoy en día, existen verdaderamente pocos estudios que exploren estas relaciones de una manera sistemática y clara. Sobre todo, al momento de la escritura de este trabajo, muy poco se ha tratado el tema de las interacciones entre cargas formales, tal vez los estudios más sobresalientes al respecto son los realizados por el grupo del profesor Roland Netz en Berlín¹¹⁹⁻¹²⁴.

Sin embargo, mucho se ha avanzado en el conocimiento de los requerimientos para que ocurra el autoensamblado de moléculas en solución. Se ha demostrado por ejemplo, que el autoensamblado de superficies hidrofóbicas de dimensiones nanométricas, requiere de una etapa de deshidratación o "dewetting", que ocurre a una determinada distancia de separación entre los cuerpos en la cual el agua se vuelve termodinámicamente inestable^{5,37,45,125}.

Estudios muy recientes también han explorado la respuesta del agua confinada entre superficies inhomogéneas, con diferentes arreglos de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos alternados. Se ha demostrado que el comportamiento del agua en

estos casos, varía de manera difícil de predecir, pero, además, existe una dependencia para nada trivial entre el comportamiento observado y la disposición de estos grupos^{5,13,14,113}. Estudios de potencial de fuerza media, demostraron que la energía de unión entre placas con la misma cantidad de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos arreglados en distinto orden dan energías de unión muy diferentes³⁷. Estos últimos hallazgos presentan indicios de una tendencia cooperativa del efecto hidrofóbico y, por lo tanto, una naturaleza no aditiva del fenómeno.

Más allá de los estudios comentados en la materia (que tratan de manera sistemática pero sin rumbo claro estas propiedades), este trabajo ha sido completamente inspirado en lo observado en sistemas biológicos y en algunos problemas planteados por parte de la novedosa "química supramolecular". Hemos visto en el estudio de estas problemáticas que existe una tendencia natural por organizar grupos hidrofóbicos en las proximidades de las interacciones de carga que se van a formar en la interfase. Ya sea en interfaces de gran tamaño y superficie plana, muy característica en uniones proteína-proteína (ejemplificado en la figura con la hormona de crecimiento humano y su receptor), o en interfaces curvas, ampliamente difundida en los sitios de enlace enzima-ligando (ver bolsillo hidrofóbico de la proteína quinasa PDK1).

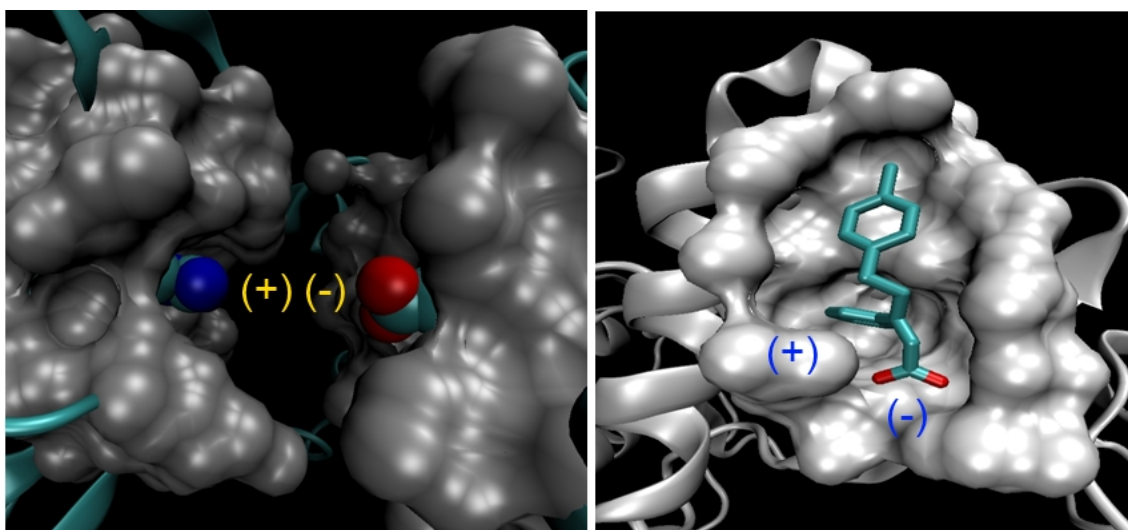


Figura 28: izquierda: interacción de cargas entre la hormona de crecimiento humano y su receptor. Derecha: interacción de cargas entre el bolsillo hidrofóbico de la enzima PDK1 y un ligando regulador de su actividad.

Como se puede apreciar, el esfuerzo por racionalizar este tipo de comportamiento no aditivo, de manera sistemática, pero en función de ciertos

lineamientos inspirados en la naturaleza, resulta de extrema relevancia, no solo para comprender los mecanismos biológicos sino también para desarrollar herramientas de diseño racional (de drogas, compuestos supramoleculares, materiales autoensamblados, etc.)

El escenario descrito anteriormente es, de alguna manera, una generalización de los conceptos desarrollados por el Prof. Ariel Fernández, con probada eficacia en el diseño racional de medicamentos^{34,126}. El enfoque propuesto por Fernández, se basa, justamente, en el reconocimiento de interacciones electrostáticas dependientes del contexto. En particular, se concentra en la necesidad de los puentes de hidrógeno del esqueleto proteico, de ciertos grupos apolares vecinos, que protejan la interacción del ataque del agua. Se ha visto que la presencia de defectos de "arropamiento" en los puentes de hidrógeno de la superficie proteica ("dehidrones"^{34,126}) promueve la unión de moléculas con la capacidad de re-estabilizar las interacciones.

Otra teoría que sienta precedentes sobre el estudio que se va a realizar en este capítulo es la denominada "teoría del O-ring" (traducible como teoría del anillo) propuesta inicialmente por el Prof. Bogan y modificada por Li^{21,23}. El estudio de Bogan demuestra que existe una regularidad en los sitios de unión en proteínas ("hot spots") (sobre una base de datos de solo interfaces planas), por presentar algunos pocos grupos químicos energéticamente relevantes para el binding (utilizando el método de alanine scanning, es decir mutando uno por uno los residuos de la interfase por alanina), rodeados de residuos cuya identidad química no es demasiado relevante pero que "acondicionan" la interfase ocluyendo al solvente. En definitiva, estos residuos del anillo, modulan la constante dieléctrica efectiva y la disposición geométrica del agua para reforzar las interacciones relevantes (esto último no ha sido explicitado en los trabajos citados).

En este contexto, el objetivo del estudio presentado en lo que queda del capítulo es la racionalización de la naturaleza no aditiva de las interacciones no covalentes que gobiernan los procesos de ensamblado. Analizaremos este efecto en sistemas modelos muy simples, representados por superficies planas en las que se coloca una carga reactiva en el centro, rodeada por entornos químicos diferentes. Los resultados obtenidos darán cuenta de la posibilidad de modular interacciones de carga por medio de la elección de los grupos del

entorno. Así demostraremos que, mientras más hidrofóbico sea el comportamiento del material, mayor resultara la interacción entre cargas en entornos acuosos.

Metodología

Descripción de los sistemas

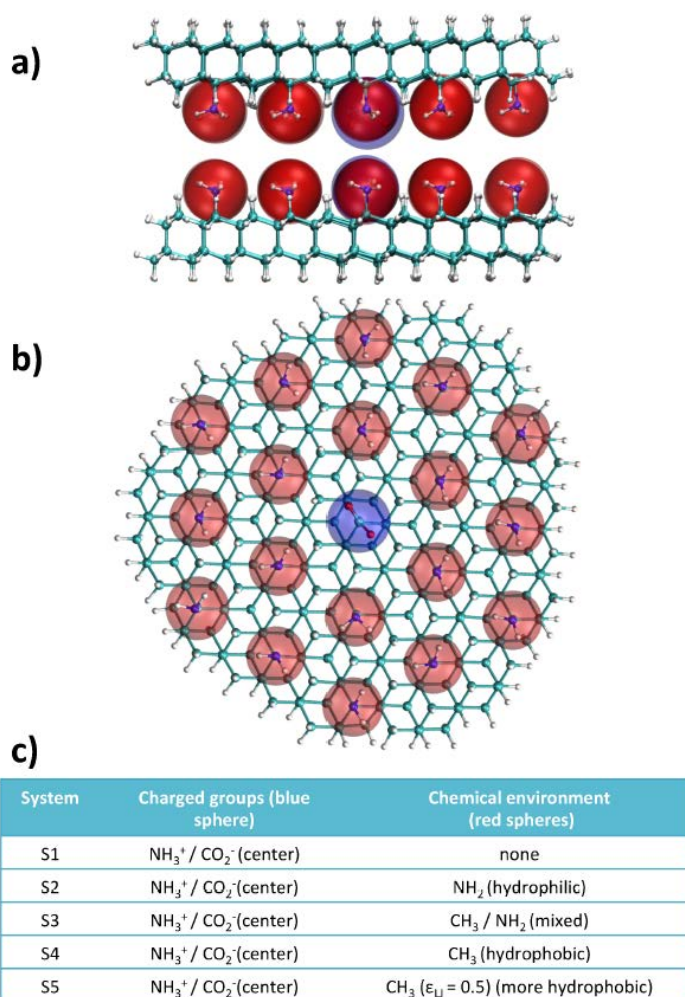


Figura 29: descripción de los sistemas de estudio. (a) vista lateral del sistema. (b) vista superior. (c) descripción de los sustituyentes utilizados en el centro de la placa (esfera azul en "a" y "b") y como entorno químico de las cargas (esferas rojas).

En este capítulo estudiamos la termodinámica de unión de dos placas modelo equivalentes y paralelamente enfrentadas, tanto en agua como en vacío. Cada placa fue construida funcionalizando los grupos superficiales de una estructura de diamante, resultando en una estructura de hexágonos, muy similar en geometría a la placas autoensamblada hexagonal que se obtiene sobre la cara (1.1.1) del oro. El primer grupo de sistemas ensayados esta compuesto por sistemas de placas con una carga central, rodeada de entornos con grupos de polaridad creciente (como se muestra en la figura). Todos los sistemas fueron hidratados con el modelo de agua TIP3P dentro de una caja rectangular de aproximadamente 5x7x5 nm con condiciones periódicas de contorno. Las simulaciones moleculares fueron llevadas a cabo en GROMACS^{72,73} package versión 5.1.1 con los campos de

En este capítulo estudiamos la termodinámica de unión de dos placas modelo equivalentes y paralelamente enfrentadas, tanto en agua como en vacío. Cada placa fue construida funcionalizando los grupos superficiales de una estructura de diamante, resultando en una estructura de hexágonos, muy similar en geometría a la placas autoensamblada hexagonal que se obtiene sobre la cara (1.1.1) del oro. El primer grupo de sistemas ensayados esta compuesto por sistemas de placas con una carga central, rodeada de entornos con grupos de polaridad creciente (como se muestra en la figura). Todos los sistemas fueron hidratados con el modelo de agua TIP3P dentro de una caja rectangular de aproximadamente 5x7x5 nm con condiciones periódicas de contorno. Las simulaciones moleculares fueron llevadas a cabo en GROMACS^{72,73} package versión 5.1.1 con los campos de

fuerzas AMBER99 y GAFF. Todos los enlaces fueron restringidos usando el algoritmo LINCS y la interacciones electrostáticas de largo alcance fueron evaluadas según el método PME.

Para el potencial de fuerza media (PMF) utilizamos dinámicas sesgadas con umbrella sampling a incrementos en la distancia entre las placas de 0.3nm. Todas las ventanas de muestreo fueron primero equilibradas por 2ns seguida de una etapa de recolección de datos por 4ns adicionales. El potencial de sesgo fue elegido teniendo en cuenta la energía requerida para sobrepasar la barrera de energía para la deshidratación de cada sistema. Para el cálculo del potencial de Fuerza media se empleo el método WHAM (descrito en el capítulo 3).

Finalmente, para establecer herramientas de comparación, realizamos estos mismos procedimientos para placas con los mismos entornos químicos pero sin la carga central.

Se utilizaron también las dinámicas de umbrella sampling para calcular propiedades de interés a medida que las placas se aproximan entre sí.

Para terminar, realizamos un mapeo termodinámico de solvatación de las superficies aisladas, utilizando el método GIST¹²⁷⁻¹²⁹ (Grid Inhomogeneous Solvation Theory) recientemente incluido en AmberTools.

Resultados

Potenciales de fuerza media para el ensamble de placas cargadas

En la figura 30 se muestran los perfiles de energía obtenidos para placas cargadas con distintos entornos químicos en función de la distancia que las separa. Las energías de binding se obtienen de la diferencia en energía entre el primer mínimo (mínimo absoluto) y el plateau a grandes distancias. Entonces, de este gráfico se puede concluir que existe una clara tendencia: a medida que aumenta la hidrofobicidad de los grupos rodeando la carga, el valor absoluto de la energía de unión aumenta.

Adicionalmente, las posiciones y tamaños de los picos y valles secundarios, nos dan información sobre las diferentes etapas del proceso de deshidratación. Más aún, el último hombro en el paisaje de energía antes de la deshidratación

completa, muestra la distancia exacta a la que la capa final de agua comienza a ser termodinámicamente inestable.

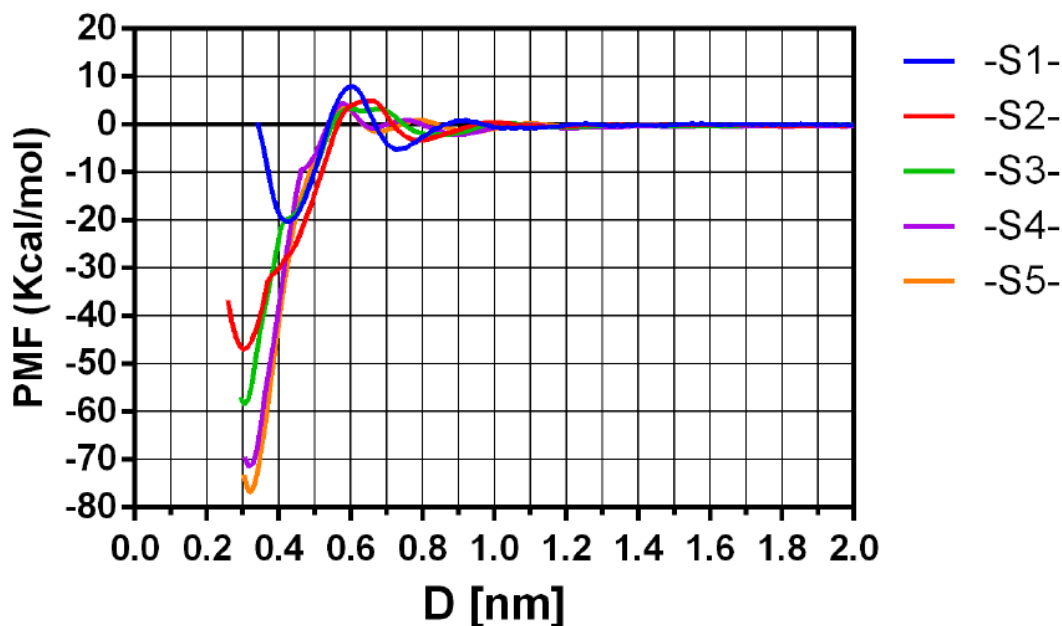


Figura 30: potencial de fuerza media obtenido en agua para los sistemas cargados. La leyenda corresponde a la nomenclatura de los sistemas mostrada en la figura 27.

En correlato con las tendencias observadas para las energías de binding, la distancia a la que ocurre la deshidratación completa entre las placas (dewetting) decrece progresivamente a medida que las placas se tornan más hidrofílicas (ver también figura 32). Entonces, las placas hidrofóbicas cargadas inducen el secado a distancias nada triviales, pues son significativamente mayores que el ancho regular de la capa de hidratación en superficie. En cambio, el colapso de placas hidrofílicas ocurre solo cuando la última capa de agua es removida por efecto estérico.

Una observación menor pero pertinente para aclarar el gráfico anterior es el caso espacial del S1, en el cual no hay grupos funcionales rodeando la carga (la carga sobresale al plano de la placa) y, entonces, ese espacio disponible es ocupado por una capa extra de agua. En esta situación, el mínimo del PMF aparece a distancias mayores que en los otros casos, debido a la imposibilidad del sistema para desplazar esa última capa por medios estéricos.

Con el objetivo de aislar de la energía de unión el efecto producido por el agua, en la siguiente figura se muestra el potencial de fuerza media inducido por el agua. Este gráfico se obtiene de la diferencia entre el PMF en agua (mostrado anteriormente) y el PMF para el mismo sistema obtenido en vacío. Dado que

todo el proceso de ensamblado en vacío es gobernado primariamente por las interacciones electrostáticas entre las cargas (interacciones de largo alcance), todos los perfiles de energía obtenidos en vacío son muy similares (con una diferencia máxima del 12%). Por lo tanto, podemos concluir que toda la diferencia en la energía de enlace observada en agua se debe a la diferencia en la incidencia del agua sobre las interacciones. Una observación interesante digna de mencionar antes de pasar al siguiente estudio, es que todos los perfiles energéticos inducidos por el agua muestran valores positivos (i.e. repulsivos), más característicos de superficies hidrofílicas. En realidad, lo que se ve es que, a medida que agregamos grupos más hidrofóbicos rodeando a la carga, el comportamiento global de la placas se torna "menos hidrofílico", o menos repelido por el agua.

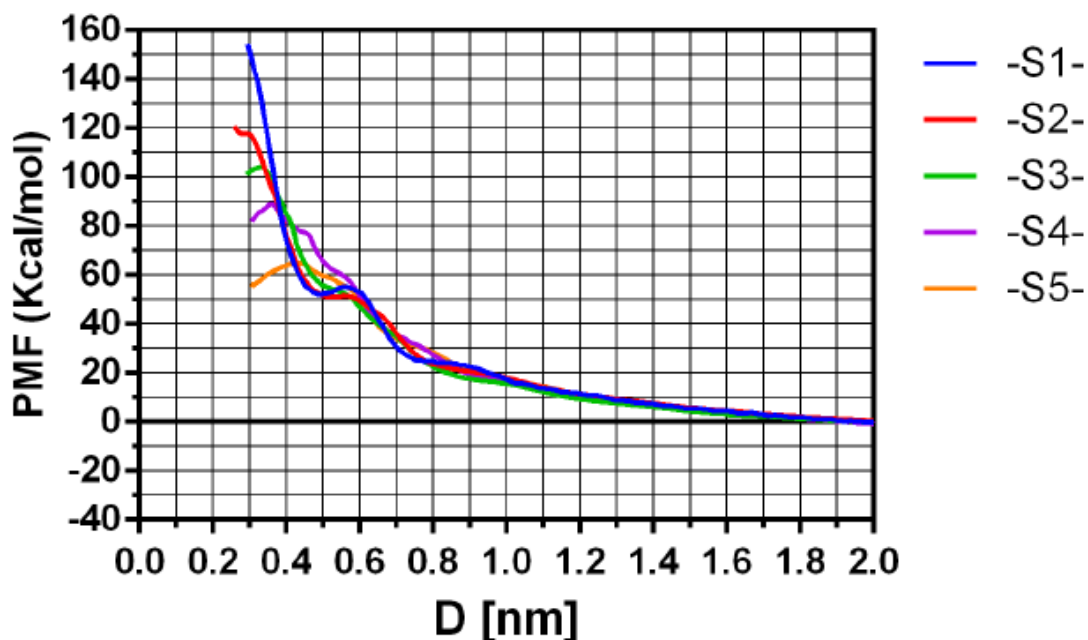


Figura 31: PMF de unión inducido por el agua, obtenido de sustraer el PMF en vacío al obtenido en agua.

Este comportamiento casi hidrofílico es razonable si tenemos en cuenta la influencia de las cargas netas (ver sección PMF de placas neutras).

Antes de proseguir con el estudio de placas neutras solo queda presentar algunos análisis de los cambios en los comportamientos del agua a medida que las placas se aproximan entre sí. Todos estos estudios se realizaron sobre las ventanas equilibradas de umbrella sampling.

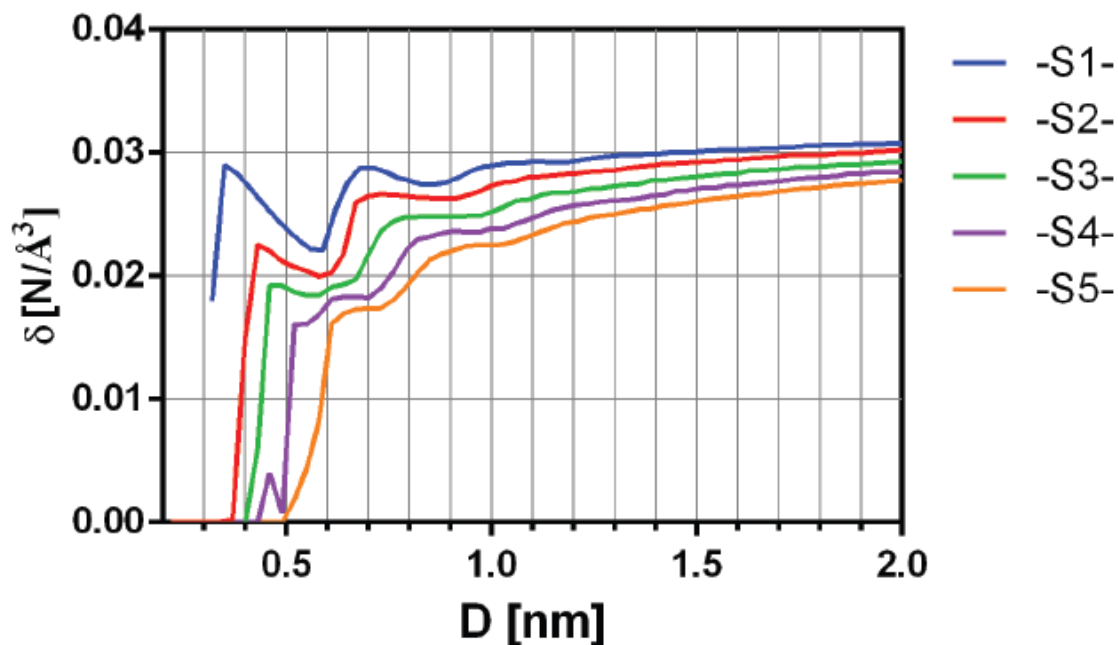


Figura 32: densidad promedio de agua entre las placas en función de la distancia que las separa.

En la figura 32 se muestra la densidad de agua en función de la distancia entre las placas, calculada como el promedio en la densidad de todas las moléculas que ocupan el espacio entre las placas, promediado además sobre los 4ns de la simulación de muestreo.

Como se puede ver en la figura, las gráficas de densidad corroboran lo dicho al analizar los PMF: la densidad decae mucho antes en las placas que se comportan más hidrofólicamente. Es decir, el proceso de secado ocurre en las placas hidrofóbicas a distancias conmensurables con la capa de hidratación (es posible acomodar todavía una capa de agua), en cambio, el secado de las placas hidrofílicas ocurre solo cuando no es suficiente el espacio entre las placas para mantener la hidratación. Esto último demuestra que el secado ("dewetting") no es un efecto gobernado por el factor estérico, sino que en sistemas hidrofóbicos, el agua se vuelve termodinámicamente inestable mucho antes de sufrir restricciones espaciales.

Más allá del valor abstracto de densidad comentado anteriormente, es interesante analizar también la distribución local de esa densidad entre las placas. Con este objetivo en mente, a continuación se muestra una representación en dos dimensiones de la distribución de densidad espacial, a una distancia relevante (0.62nm) para dos casos extremos de comportamiento: S2 (comportamiento hidrofílico) y S4 (hidrofóbico).

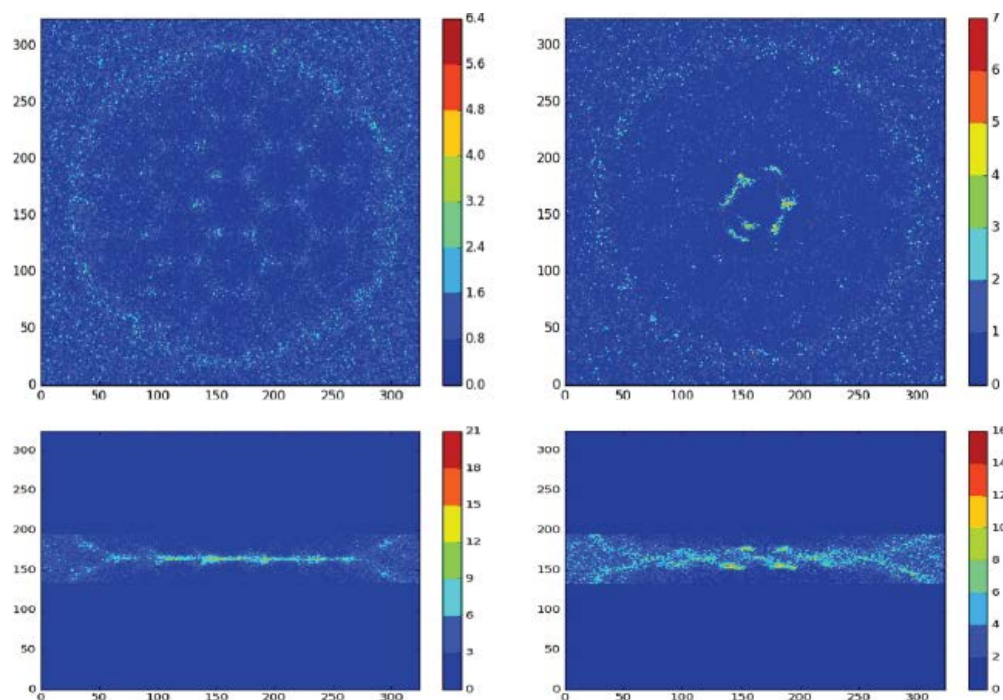


Figura 33: Mapa bidimensional de la densidad de agua local para (izquierda) el sistema S4 (entorno hidrofóbico) a 0.62 nm de distancia entre las placas y (derecha) para el sistema S2 (entorno hidrofílico) a la misma separación. En ambos casos se muestra arriba la vista superior y abajo la vista lateral.

Tanto la perspectiva lateral de las placas como la superior nos dan una idea de la influencia del entorno en el ordenamiento local del agua próxima a la carga central. Los grupos metilo terminales claramente promueven la deshidratación local en las cercanías de la carga en la situación de confinamiento, mientras que las cargas rodeadas por grupos NH_2 permanecen fuertemente hidratadas a la misma separación entre placas. Una observación interesante que no hemos terminado de explorar es el aparente incremento de la densidad en los bordes de las placas para ambos sistemas, probablemente justificada por la capacidad del agua bulk para formar puentes de hidrógeno con el agua entre las placas. Por último, se puede advertir un claro ordenamiento del agua en la placa terminada en CH_3 , lo que sugiere (como ya hemos dicho) una naturaleza no del todo hidrofóbica.

Perfiles de energía en placas neutras.

Análogamente a lo explicado para placas cargadas, aquí se presenta el mismo tipo de estudio, pero reemplazando la carga central en cada caso, por el mismo grupo funcional del entorno.

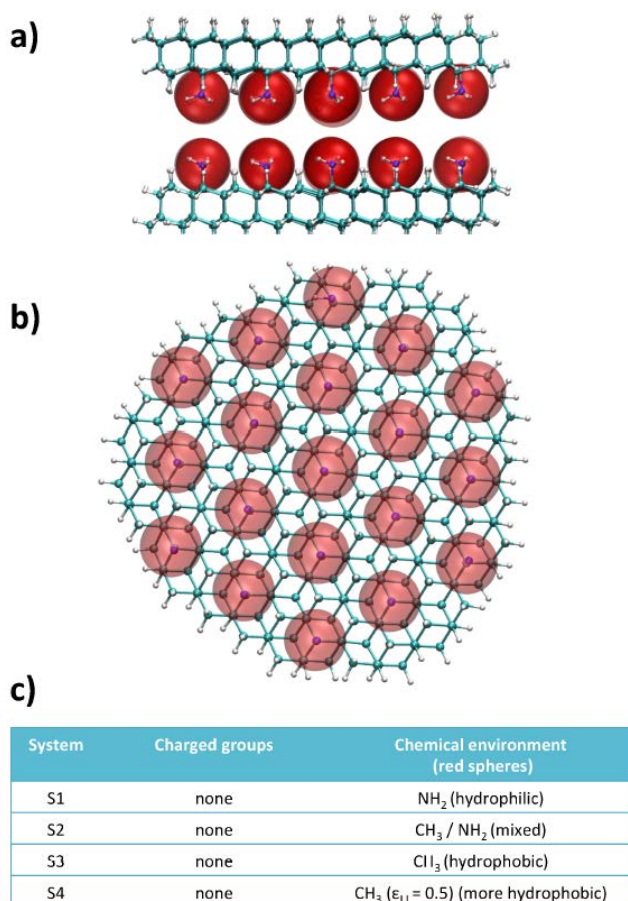


Figura 34: descripción de los sistemas neutros estudiados. (a) vista lateral. (b) vista frontal. (c) descripción de los grupos utilizados para funcionalizar la superficie (notar que fueron reemplazados los grupos centrales mostrados en la figura 27 -antes cargados- por los mismos grupos utilizados en el entorno).

sistema uno (entorno hidrofílico). Esto se puede deber a la contribución conjunta de varios componentes menores. Por ejemplo, sabemos que el efecto hidrofóbico depende de todo el volumen del sistema y no solo de la identidad química de la cara funcionalizada, además, es posible que los grupos NH₂ logren cierto grado de interacción electrostática una vez que el agua es expelida.

Otra confirmación de los aspectos que venimos detallando a lo largo del capítulo, proviene de la ubicación de los picos y valles observados en este nuevo estudio. Como se puede notar, éstos coinciden puntualmente con los observados en placas cargadas, esto quiere decir, que el comportamiento del solvente en la interfase está primariamente gobernado por la química colectiva de la superficie y no es sustancialmente alterado por la presencia de cargas.

Estos estudios nos permitirán poner de manifiesto la naturaleza sinérgica (i.e. no aditiva) que existe entre la interacción de cargas y el efecto del entorno.

Una vez obtenidos los perfiles de energía libre de asociación, completamente equivalentes a los obtenidos para las placas cargadas con las que comparten entornos químicos, podemos notar, que las diferencias observadas en el primer caso, prácticamente desaparecen al reemplazar las cargas por grupos neutros. Tal vez, la observación más desconcertante es el valor negativo (favorable) de la energía de binding para el

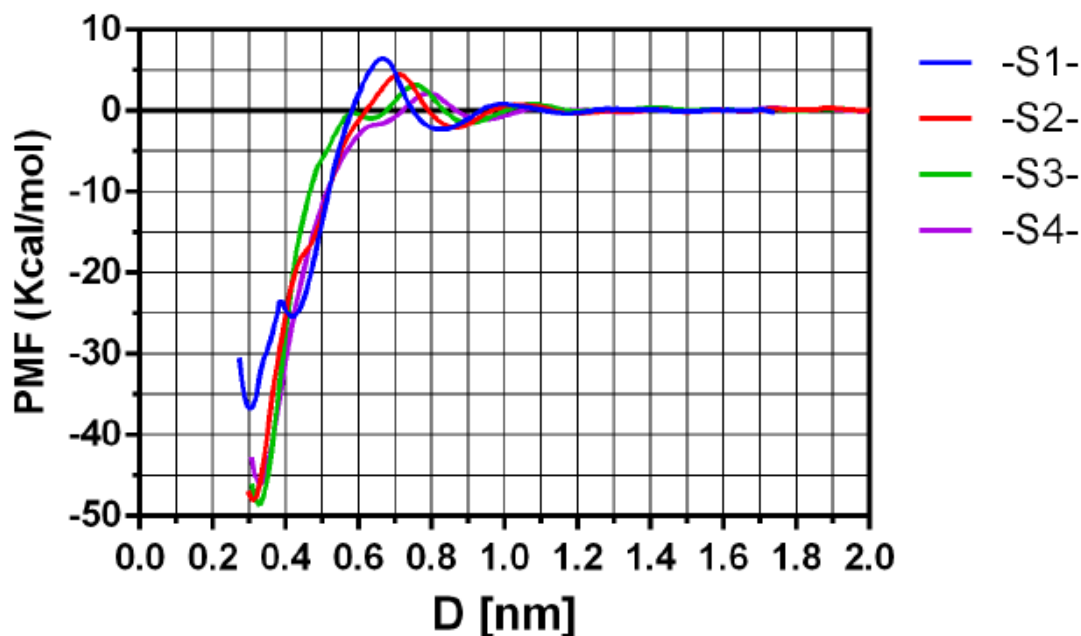


Figura 35: Perfil de energía obtenido para el ensamble entre placas neutras en agua. La leyenda utiliza la misma nomenclatura descrita en la figura 32.

A continuación describiremos la influencia del agua en los perfiles de energía obtenidos en placas neutras. Aunque no es el objetivo de este estudio establecer un análisis riguroso del proceso de ensamblado de placas neutras, un mejor entendimiento de estos sistemas, puede proveernos de herramientas conceptuales para entender la dependencia entre el agua nanoconfinada y la estructura química de las superficies.

Como se puede ver en la figura N° 35, excepto por la placa con parámetros de Lennard-Jones atenuados a la mitad, el efecto del agua es siempre repulsivo. Resultados previos en sistemas grafíticos (que han demostrado un comportamiento más cercano al hidrofílico que al hidrofóbico^{80,93,105-107,130}) sugieren que este efecto se debe al denso empaquetamiento de carbono de las placas de diamante allí utilizadas. De hecho, los términos de interacción de Van der Waals de las placas, podrían ser suficientemente importantes como para competir eficientemente con la interacciones agua-agua. En efecto, esta es la razón por la que decidimos incluir un sistema con interacciones de Lennard-Jones atenuadas (una estrategia que ya habíamos utilizado en el estudio de las propiedades del grafeno⁸⁰) como sistema de referencia con propiedades netamente hidrofóbicas.

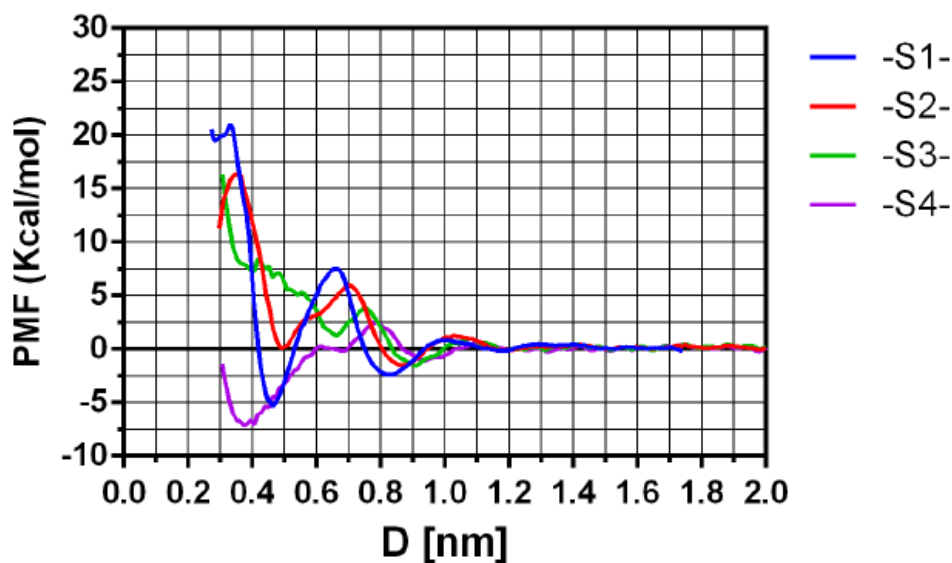


Figura 36: PMF de unión entre placas inducido por el agua, obtenido restando el PMF obtenido como la diferencia entre los PMFs obtenidos en agua y en vacío.

Comparación directa entre sistemas neutros y cargados

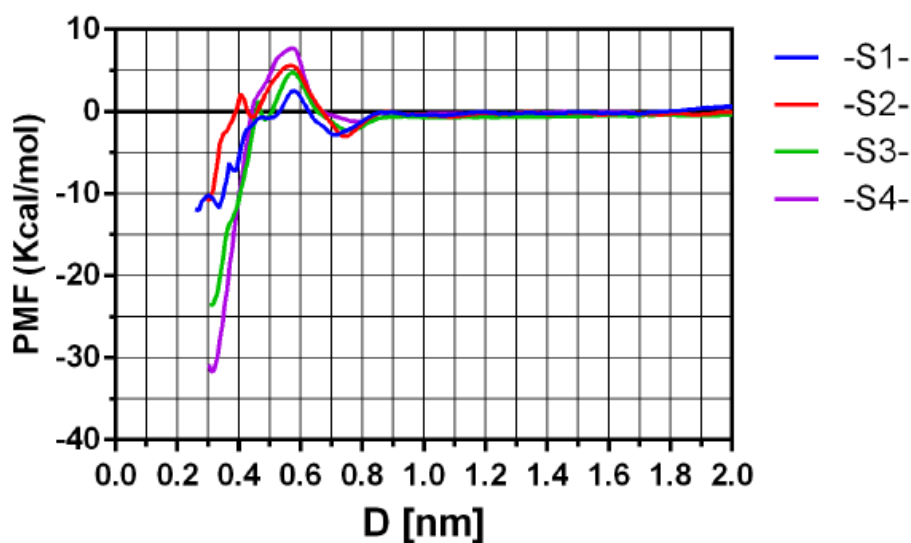


Figura 37: PMF resultante de sustraer el PMF de los sistemas neutros a aquellos equivalentes en sistemas cargados (mismos grupos funcionales en el entorno al grupo central)

Para poder discriminar adecuadamente la contribución contexto-dependiente de las interacciones electrostáticas, en la siguiente figura se ilustra el resultado de restar los paisajes de energía obtenidos para placas neutras, de sus relativos en placas cargadas. Dado que la única diferencia entre ambos sistemas es que en los sistemas neutros las cargas son reemplazadas por grupos del entorno, el efecto observado será mayormente debido a la energía libre resultante de agregar una carga central en cada sistema.

De este cálculo se puede concluir que existe una fuerte variación de la energía requerida para incluir exactamente la misma carga, dependiendo del entorno químico en la que se la coloca. De hecho, los dos extremos en comportamiento presentan una diferencia de aproximadamente 20 kcal/mol.

Estudio de placas con cargas en distinta localización

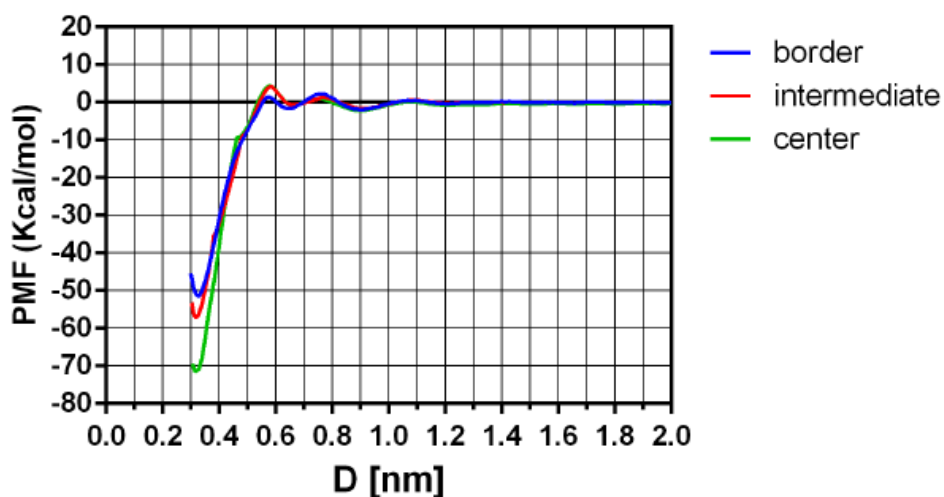


Figura 38: PMF para placas de idéntica carga y entorno (-CH₃) en agua. En azul: carga posicionada en el borde de la placa. Verde: carga en el centro de la placa. Rojo: posición intermedia a las anteriores.

Para inspeccionar con mayor profundidad la naturaleza contexto-dependiente de las interacciones electrostáticas, en esta sección consideraremos placas con exactamente la misma carga y el mismo entorno químico, pero desplazando la carga sobre distintas posiciones de la superficie. Para este estudio se prepararon tres sistemas con placas terminadas en metilos (CH₃) ubicando la carga en tres posiciones: centro, intermedio y borde. En todos los casos, la contraplaca es idéntica pero de carga contraria, de manera de que las posiciones se correspondan. Para resumir, estamos estudiando tres sistemas hidrofóbicos, químicamente idénticos, cuya única diferencia radica en la disposición espacial de los grupos superficiales; así, cualquier diferencia de comportamiento puede ser solo atribuida, justamente, al efecto no aditivo entre la carga y el entorno.

Se comprueba en la figura que el valor del mínimo obtenido para la placa con cargas centrales es mucho más pronunciado que para aquel con la carga en el borde (con un comportamiento intermedio pero más cercano al observado para el sistema con carga central para el sistema "intermedio"). Es evidente que, en

el proceso de ensamblado, aquellas cargas más protegidas del ataque del agua (aquellas rodeadas de grupos hidrofóbicos) tienen la capacidad de interactuar más intensamente. Mientras que en las cargas en el borde de la interfase, más expuestas al solvente, este requisito no es completamente satisfecho.

Es sobresaliente el hecho de que en superficies biológicamente activas, los sitios más reactivos se presentan justamente arreglados de tal forma, que las interacciones fundamentales, centradas en la superficie quedan resguardadas del solvente^{21,23}.

Análisis sobre placas aisladas

Para concluir el estudio de las propiedades del solvente en contacto con las superficies implementadas en este capítulo, se realizaron estudios en placas en solitario; es decir, para cada placa por separado.

El primer resultado que se mostrará corresponde al Potencial de Fuerza Media de moléculas de agua a medida que se acercan a la carga central. Esta estimación se realizó a partir de la función de distribución radial de carga-agua (tomando semicírculos de muestreo de radio crecientes centrados en las cargas). Una vez obtenida la $g(r)$, el PMF se calcula como: $PMF(r) = -k_B \ln g(r) + C$. siendo k_B la constante de Boltzmann y "r" la distancia a la carga.

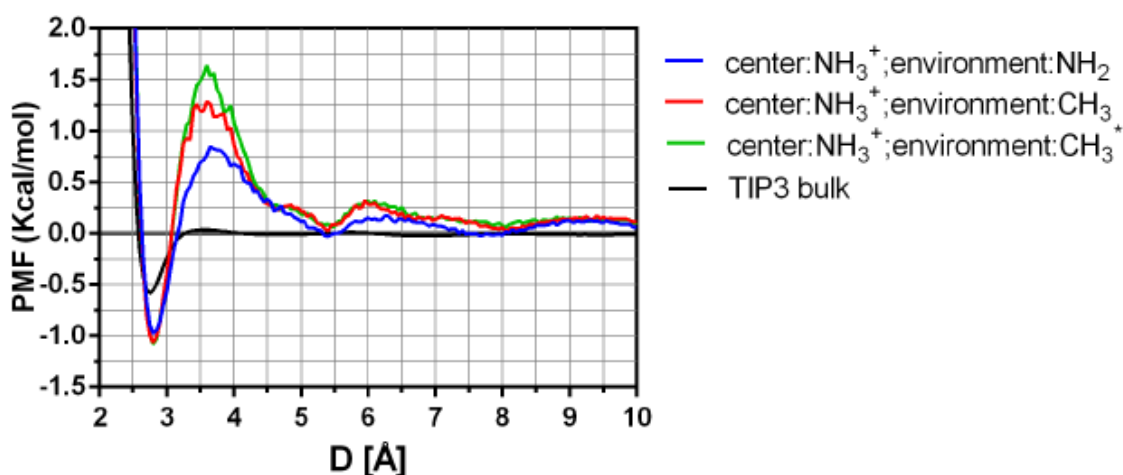


Figura 39: perfil de energía de unión de agua al centro de placas aisladas.

Del paisaje de energía obtenido podemos inferir que, si bien no existe una diferencia en el cambio de energía libre resultante de "traer" una molécula de

agua desde el bulk hasta las proximidades de la carga, la energía requerida para sobrepasar la barrera de activación es significativamente mayor a medida que la placa se torna más hidrofóbica (aproximadamente 1 kcal/mol, que es en efecto, la misma magnitud que la profundidad del pozo de potencial).

Este hecho nos está indicando el costo energético de desplazar las moléculas de agua rodeando la carga. Esto es particularmente relevante si se piensa que la "facilidad" de remoción de esas moléculas es susceptible de ser extrapolada a la situación en la que, en lugar de otra molécula de agua, un ligando se aproxima a la carga.

Teoría de solvatación inhomogénea (GIST)

Para el estudio de GIST, se emplearon los mismos tres sistemas utilizados en el cálculo del PMF del agua (placas terminadas en NH_2 , CH_3 y CH_3^* con L-J atenuado).

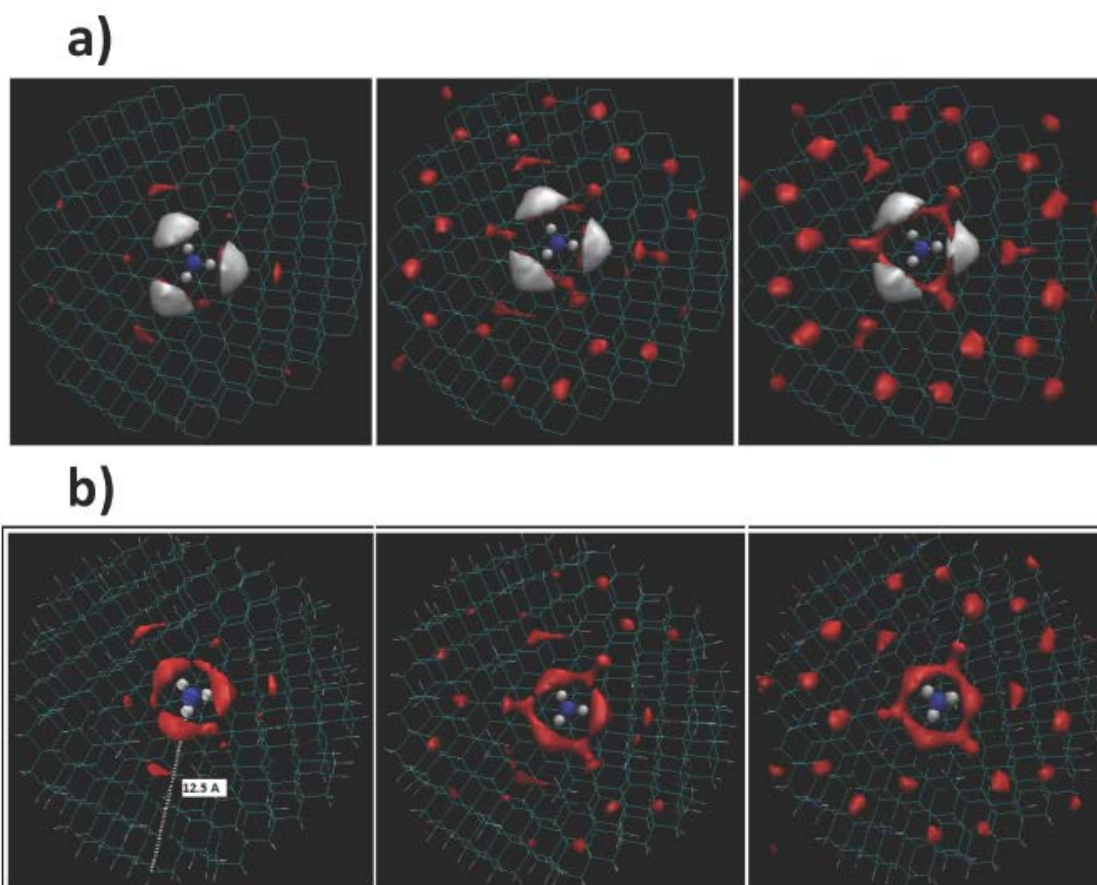


Figura 40: (a) Estudio GIST para sistemas; hidrofílico (izquierda), hidrofóbico (centro) e hidrofóbico con interacciones de L-J atenuadas a la mitad (derecha). Los volúmenes en rojo representan los sitios en los que la densidad de oxígeno es cuatro veces mayor que en el agua bulk y los volúmenes en color blanco indican los sitios en los que la densidad de hidrógeno es cuatro veces la del bulk. (b) Estudio GIST para moléculas de agua con al menos una energía de interacción de al menos 0.1 kcal/mol.

En la figura "a" se puede ver que el sistema más fuertemente hidrofóbico (L-J modificado) posee una mayor propensión a la deshidratación, incluso en las regiones próximas a la carga, mientras que el sistema terminado en NH_2 es el que presenta agua más fuertemente unida (sitios con densidad cuatro veces mayor que la del bulk).

Es interesante mencionar que las moléculas de agua en contacto directo con la carga parecen ser las únicas con una clara tendencia a orientarse preferencialmente.

El gráfico "b" a su vez, muestra las regiones donde el solvente interactúa con energías significativamente superiores a la media (energías de al menos 0.1 kcal/mol). Este gráfico muestra, como era de esperar, una interacción exacerbada del solvente para las placas hidrofílicas comparado con las hidrofóbicas. En particular, podemos distinguir claramente un anillo bien definido de agua fuertemente unida a la carga. La superficie más hidrofóbica, a su vez, muestra un patrón de solvatación más débil, incluso alrededor de la carga (el anillo no es completamente visible). Este factor es un fuerte indicador de la facilidad de remoción del agua en las proximidades del sitio de interacción.

Por supuesto, dado que estamos trabajando sobre superficies aisladas, el efecto de confinamiento no es completo, y por lo tanto, el agua tiene la capacidad de hidratar cualquiera de los sistemas. En este caso, estamos tomando en cuenta apenas una leve diferencia en la facilidad de deshidratación de las distintas superficies, pero, aún así, esto es relevante debido a que esta tendencia se ve exacerbada al agregar el efecto del confinamiento (como quedó claro en los perfiles del PMF).

Conclusiones del capítulo

En este trabajo hemos mostrado claras evidencias, por medio del cálculo de perfiles de energía libre, de que el incremento en las propiedades hidrofóbicas de una superficie exacerban, de manera no aditiva, las interacciones de carga en confinamiento. Hemos demostrado además, que este efecto se debe exclusivamente a un comportamiento diferencial del solvente en dichas superficies. Más aún, de la diferencia obtenida de sustraer los PMF para placas

neutras de sus análogas cargadas, aprendimos que se puede modular una misma interacción para dar diferencias energéticas de como mínimo un 20%.

Al mismo tiempo, probamos que este efecto se puede lograr, incluso, alterando la configuración espacial de un mismo background químico, probando que las diferencias de interacción dependen, en efecto, del grado de protección local de la interacción de cargas frente al ataque del agua.

Finalmente, hicimos evidente el hecho de que a medida que se aumenta el carácter hidrofóbico de los sistemas (incluso en placas sin su par) la propensión a la deshidratación aumenta en el entorno local de las cargas, exacerbando la energía almacenada electrostáticamente y promoviendo el autoensamblado.

Nuestros resultados en sistemas modelos, otorgan un sólido soporte conceptual al escenario propuesto para la unión de proteínas, donde el entorno hidrofóbico local corresponde a un ingrediente primordial para modular las interacciones electrostáticas en la interfase.

Capítulo 5

Interacciones electrostáticas en medios complejos

Introducción.

Como hemos venido advirtiendo en todo el desarrollo conceptual de los capítulos precedentes, existe una muy importante interdependencia entre los distintos factores que tienen la facultad de alterar el binding y el reconocimiento molecular de superficies. El objetivo de este capítulo es establecer las conexiones pertinentes entre las nociones fundamentales que fuimos ganando, recuperando y construyendo durante el desarrollo de la tesis, para poder aplicarlas en sistemas química y estructuralmente complejos como es el caso de las proteínas (y en general cualquier sistema biológico).

Como hemos anteriormente señalado, la química proteica y enzimática es increíblemente compleja, sobre todo si se tiene en cuenta que se basa en la permutación de apenas una veintena de subunidades químicamente diferentes (los aminoácidos). Es evidente, que la fisicoquímica natural ha conseguido por medio de la evolución, generar una increíble riqueza a partir de tan escasos elementos, haciendo uso de un extenso arsenal de herramientas basadas en una relación dinámica entre la estructura de la proteína y el ordenamiento del agua circundante.

La química de proteínas depende de sus cuatro niveles de organización estructural. La estructura primaria, que está determinada exclusivamente por la secuencia de aminoácidos que la constituyen, es de alguna manera el núcleo que contiene toda la información química necesaria para cumplir con la función biológica pero que, por sí misma, carece completamente de reactividad. A partir de esta estructura primaria, la proteína tiene que, en primer término formar su estructura secundaria, cimentada en la formación de puentes de hidrógeno de lo que luego será el "backbone" o columna vertebral de la proteína. En última instancia, la estructura secundaria de hélices y hojas debe adoptar una disposición espacial particular de las distintas porciones localmente estructuradas para, finalmente, completar los requisitos para cumplir con su

actividad biológica. Existe un nivel de estructuración superior que, básicamente, se trata de la organización de varias subunidades proteicas para formar una estructura multimérica funcional, aunque esto no es necesariamente un requisito indispensable para la actividad bioquímica de proteínas y, de hecho, no será tratado en este trabajo.

Es evidente, según la descripción anterior sobre las características estructurales que determinan la actividad química de las proteínas que, para entender los motivos fisicoquímicos de su funcionamiento, es indispensable desarrollar elementos conceptuales distintos de los utilizados para el entendimiento de los procesos químicos tradicionales (sintéticos)¹⁸. De hecho, prácticamente no existe precedente en la química sintética de la necesidad de una organización espacial particular para determinar la reactividad de un compuesto químico.

¿Por qué es importante la estructura tridimensional de las proteínas?

Esta pregunta tiene al menos dos aristas importantes: ¿por qué se pliegan las proteínas? y ¿cuál es la consecuencia de ese plegamiento en su actividad química?

Si bien, por supuesto, ninguno de estos interrogantes pretende ser totalmente resuelto en este trabajo, se presentan en este apartado un resumen de lo que constituye el estado del conocimiento actual sobre estas materias, más algunas pistas de los aportes de este trabajo en el tema.

Las razones fisicoquímicas que gobiernan el plegamiento de proteínas son, como puede suponerse, las mismas reglas termodinámicas que hemos venido mencionando hasta aquí¹³¹. Si se quiere, lo que caracteriza la termodinámica en proteínas y, en general, la termodinámica de la vida, es el delicado estado de equilibrio que se establece entre la proteína plegada (activa) y desnaturalizada (inactiva). De hecho, la energía que separa un estado del otro se estima en apenas unas 5-10 Kcal/mol^{16,18}. Las proteínas se debaten continuamente entre un estado desplegado en el que prevalece la entropía y un estado más condensado, en el que se paga el precio entrópico, a partir de los puentes de hidrógeno inter e intra moleculares que se forman en el plegado y de otras contribuciones tales como el efecto hidrofóbico, interacciones de Van der Waals, etc.

Es justamente por la precariedad del equilibrio termodinámico que se establece en la disposición espacial de las proteínas, que existe cierta "flexibilidad" y libertad de movimiento intrínseca en su estructura. Después de todo, la proteína tiene todo un abanico de estructuras localmente estables dentro del paisaje de energía conformacional¹⁸.

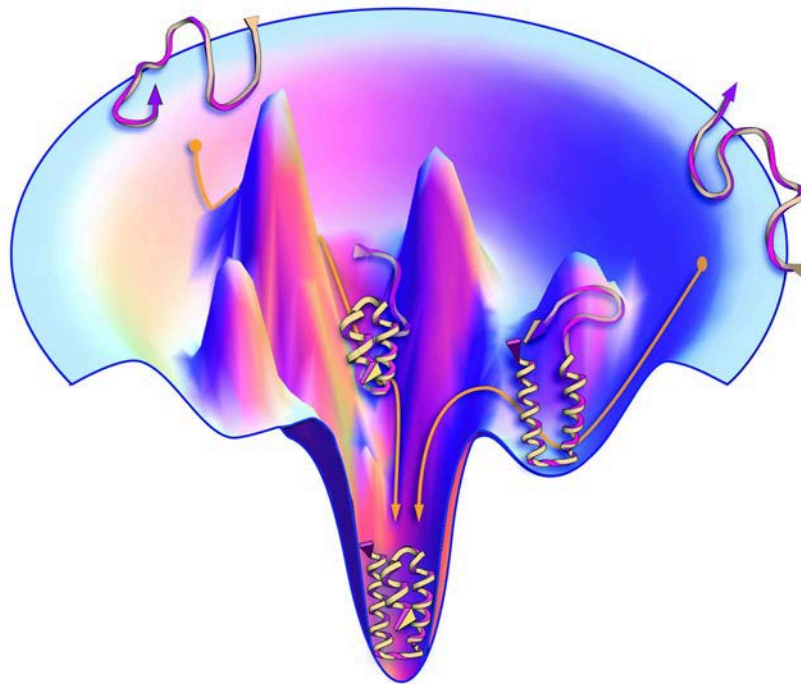


Figura 41: Esquema de la teoría del paisaje conformacional característico del plegamiento de una proteína. La parte superior corresponde a estados de mayor energía y la inferior a estados menos energéticos.

Una característica interesante del panorama de contribuciones al plegamiento de una proteína es que prácticamente no existe una diferencia en la energía de hidratación entre la proteína en su estado nativo y en su estado desnaturalizado. Esto se debe a que, en la estructura tridimensional del estado plegado, existe una clara tendencia de la proteína a exponer sus residuos aminoacídicos cargados y más fuertemente polares hacia la superficie exterior en contacto con el agua de hidratación.

En lo que respecta al entendimiento de los motivos que gobiernan el plegamiento, actualmente se cuenta con dos herramientas experimentales invaluable: la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, ambas técnicas poseen sus pros y contras: la cristalografía de rayos X por ejemplo, posee una capacidad de resolución de estructuras tridimensionales inigualable, no obstante, solo captura una única estructura, esencialmente, la estructura termodinámicamente

más estable (probable), que más allá de otros problemas relacionados al condicionamiento espacial que impone la estructura cristalina, subestima justamente esa variabilidad dinámica que poseen las proteínas; la espectroscopia de RMN, por otro lado, posee la capacidad de capturar la dinámica de la proteína en solución, pero tiene la enorme desventaja de ser solo aplicable a sistemas relativamente pequeños (menores a 30 kD). Las estadísticas del repositorio de estructuras PDB (Protein Data Bank), muestran que el 80% de la estructuras depositadas fueron obtenidas por rayos X mientras que menos del 20% fueron resueltas por técnicas de RMN¹³².

Linus Pauling en los años cincuenta predijo correctamente la formación de estructuras secundarias en proteínas, basándose en la asunción de que la conformación más estable debía maximizar la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los residuos aminoacídicos. Estos puentes de hidrógeno, para prevalecer en un medio acuoso con fuerte propensión al apantallamiento de cargas, deben ser protegidos por las cadenas laterales de los aminoácidos aledaños. Sin embargo, hoy en día se sabe que, en realidad, este no es un requisito que deba ser cumplido en la totalidad de las regiones localmente estructuradas de la proteína. Justamente, o mejor dicho, convenientemente, aquellas zonas más reactivas de la proteína, presentan una disposición de cadenas laterales tal que, de alguna manera vulnerabilizan los puentes de hidrógeno del backbone en esa región^{21-23,31-34,133}. A lo largo de este capítulo observaremos las implicancias de esta característica para la dinámica de las proteínas en medio acuoso.

Al comienzo de este apartado nos preguntamos, además, qué consecuencias tiene la conformación espacial adoptada por las proteínas sobre su funcionamiento bioquímico. A esta altura ya se pueden empezar a elaborar algunos supuestos; por ejemplo, el hecho de que la reactividad química florezca a partir de una disposición espacial particular nos habla de que existen otros factores a tener en cuenta, más allá de la identidad química de los grupos intervinientes, lo cual, para el lector atento, puede remitir a lo desarrollado en el capítulo anterior de esta tesis.

Con respecto a las implicancias que tiene la organización estructural en la actividad proteica y enzimática, en este capítulo revisaremos como se aplican las nociones adquiridas sobre modulación de interacciones electrostáticas en

agua, primero como una característica que subyace en la estructura cristalina de la proteína, pero, más adelante, veremos también cuál es su repercusión en la dinámica de la proteína en solución.

Defectos estructurales en proteínas

Ya a mediados del siglo pasado Lumry R., Eyring, Biltonen y otros, reportaban que la transmisión de señales químicas en proteínas era un proceso activado que requiere de la presencia de "defectos" móviles en la estructura proteica^{134,135}. Según esos estudios, los efectos se manifiestan trasladando la conformación hacia distintas regiones del paisaje de energía promoviendo los estados "ligados" o unidos. En particular, Lumry interpreta estos defectos como distorsiones en la estructuración local de la proteína, que modifican incluso la red de puentes de hidrógeno y supone que esa distorsión es la fuerza impulsora detrás de los mecanismos de asociación proteína-proteína o proteína-ligando¹³⁴.

Más recientemente, las investigaciones del profesor Ariel Fernández^{34,38,126} introdujeron la idea de la existencia de puentes de hidrógeno deficientes y demostraron su relevancia en los procesos de binding en proteínas. Nuestro grupo de investigación ha colaborado intensamente con el profesor Fernández en dicha línea^{31,33,82}.

Estos puentes de hidrógeno "defectuosos", denominados Dehidrones³⁴, se caracterizan por estar insuficientemente protegidos del agua circundante. En última instancia, los motivos que justifican su empobrecimiento energético, son los mismos que discutimos en capítulos anteriores: la interacción por puente de hidrógeno es un caso particular de interacción electrostática, y por lo tanto, se ve afectada por los mismos factores que mencionamos en el capítulo 4, por ejemplo, el incremento en la constante dieléctrica local.

En los estudios conducidos por el profesor Fernández, se demuestra que en su mayoría, los puentes de hidrógeno del backbone de una proteína se encuentran "protegidos" por un número de grupos hidrofóbicos tal que previene el acercamiento de las moléculas del agua vecinas, de modo de minimizar el apantallamiento ("screening") de cargas y, por lo tanto, de maximizar la intensidad de la interacción. Los Dehidrones, entonces, son aquellos puentes

de hidrógeno que carecen de parte de esa protección y se encuentran parcialmente expuestos en la superficie de la proteína¹²⁶.

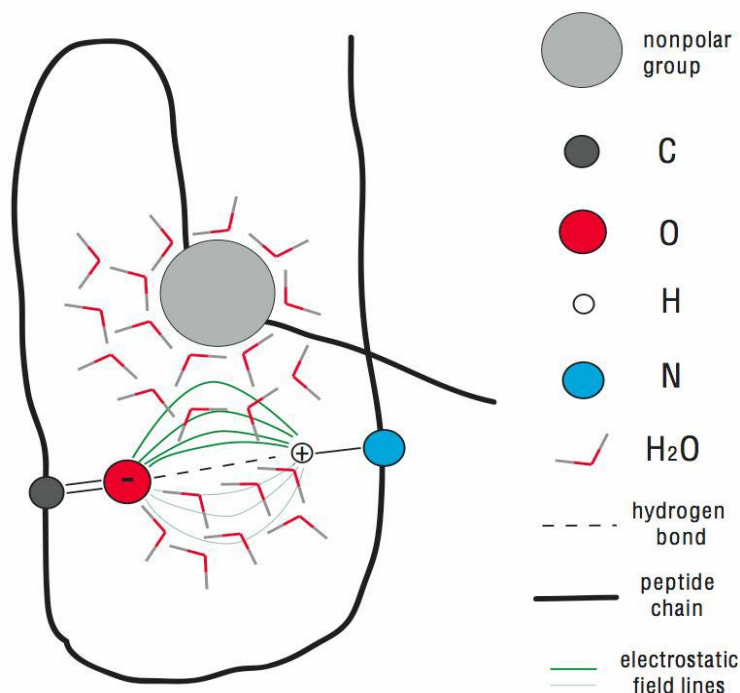


Figura 42: esquema del mecanismo de interacción que involucra tres cuerpos propuesta por el Prof. Fernández³⁴.

Es necesario, a fines de completar la descripción de este concepto, clasificar las interacciones electrostáticas en términos de su distribución de abundancia $P(\rho)$, siendo ρ el número de cuerpos apolares involucrados en la interacción, parámetro que denominaremos (grado de) "arropamiento" o "wrapping". La distribución es definida por su valor medio $\langle \rho \rangle = \sum_{\rho} \rho P(\rho)$ y la correspondiente dispersión $\sigma = (\langle (\rho - \langle \rho \rangle)^2 \rangle)^{1/2}$. Entonces, se puede concluir que las interacciones poco protegidas son aquellas cuyo número de cuerpos "protectores" resulte menor que la media menos la desviación ($\rho \leq \langle \rho \rangle - \sigma$). Se utiliza la denominación de "Dehidrones" para aquellos puentes de hidrógeno poco protegidos por cuerpos apolares.

Por último, se consideran cuerpos protectores en interacciones de este tipo a aquellos carbonos presentes en cadenas laterales de la proteína, no unidos directamente a grupos sustractores de electrones. Por lo tanto, ρ es el número de carbonos apolares a una distancia tal que actúan resguardando un puente de hidrógeno determinado del ataque del agua. Esta distancia de interacción es definida como la intersección de dos esferas de radio fijo (aproximadamente del diámetro de 3 capas de agua), centradas en los

carbonos α de los residuos que participan en la formación del puente de hidrógeno.

Para una esfera de desolvatación de 6Å se ha reportado en puentes de hidrógenos del backbone de proteínas un valor promedio de “arropadores” de: $\rho = 26.6 \pm 6.5$, por lo que el criterio de corte para considerar un puente de hidrógeno como Dehidrón resulta de $\rho = 20$.

Una de las características más sobresalientes de los Dehidrones es su adhesividad inherente. Dado que acercar grupos apolares refuerza el puente de hidrógeno de la proteína, por desplazamiento u ordenamiento del agua circundante, existe una ganancia neta de energía determinada experimentalmente de unas 3.9 Kcal/mol³⁴ que promueve la asociación con el ligando. Una contribución sin dudas significativa, teniendo en cuenta la distancia que separa un estado "activado" de uno "inerte" en el paisaje de energía potencial de la proteína.

Ya veremos, por último, que las deficiencias en el empaquetamiento local que da lugar a los Dehidrones, que además se encuentran exacerbadas en regiones de binding, otorga algunas características dinámicas al sitio también relevantes para la función biológica y la unión y reconocimiento de ligandos.

Anatomía de un "Hot Spot" (o sitio relevante de unión de proteínas)

Si bien, hasta en advenimiento de la cristalografía de rayos X moderna, la caracterización de sitios de unión de proteínas resultó por mucho tiempo un interrogante científico muy importante, existe en la actualidad una serie de observaciones respecto a las generalidades de estos sitios de vital relevancia. Aún así, hoy por hoy no existe un método confiable de predicción de hot spots, más allá de los métodos justamente cristalográficos, por los que se obtiene la resolución estructural de la proteína blanco unida al ligando.

En este trabajo, no solo aportaremos la descripción de algunas de las características generales de los sitios de unión sino que, además, elaboraremos las herramientas conceptuales que, en principio, podrían permitir el diseño inteligente, tanto de sitios de unión como de ligandos apropiados para ellos.

Dentro de las teorías más sobresalientes, más allá de las relacionadas con la satisfacción de defectos de empaquetamiento mencionadas anteriormente, se

pueden nombrar, por ejemplo la teoría del O-ring^{21,23}, o aquellas que se basan en la diferencia de movilidad del agua superficial^{22,133,134}.

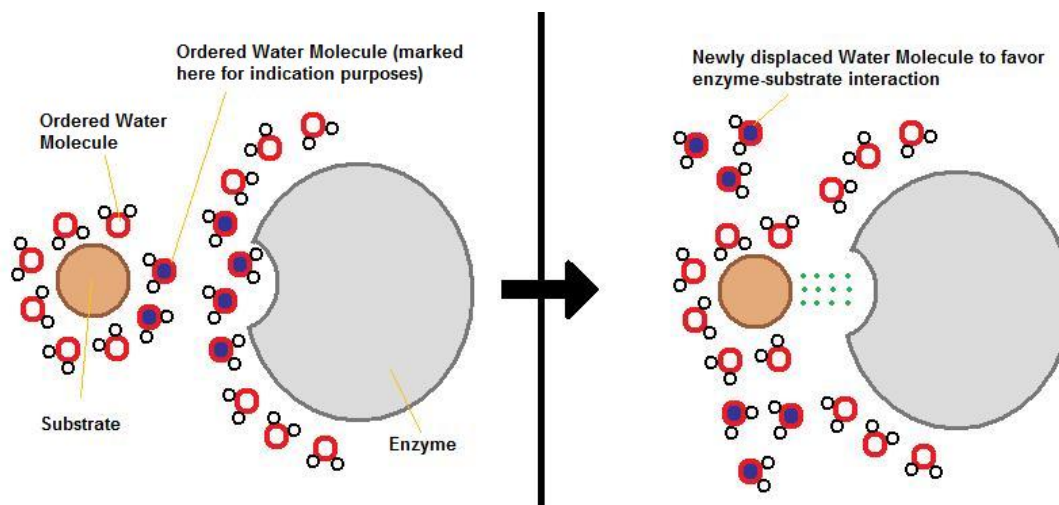


Figura 43: representación esquemática de la interacción entre una enzima y su sustrato.

La teoría del O-ring, propuesta por Bogan y corregida por Liu^{21,23}, identifica, dentro del puñado de residuos relevantes para el binding dos aportes distintos: el primero que contempla una contribución electrostática directa de unión, ya sea de cargas como del tipo puente de hidrógeno y el segundo grupo, que involucra una serie de residuos secundarios, energéticamente irrelevantes, pero que provee las condiciones del ambiente local reforzando las interacciones primarias. En definitiva, tanto esta teoría como aquellas que hablan de la facilidad de remoción del agua del sitio de unión, se aproximan al entendimiento de la importancia de incorporar al solvente como una parte trascendental para entender la fisicoquímica de los hot spots, pero no alcanzan a delinear los principios conceptuales básicos detrás de estas observaciones. En este trabajo se propone esclarecer justamente estos principios y tratar unificar los criterios antes mencionados, dentro de una misma visión más generalista de la anatomía de un hot spot.

Modulación de la actividad proteica por medio de efectores externos (regulación alostérica enzimática)

Las enzimas son proteínas globulares que funcionan catalizando reacciones biológicas. Entre ellas, las enzimas alostéricas son aquellas que, por unión de ligandos en su sitio regulador o "alostérico", modifican su actividad catalítica.

Este mecanismo de regulación funciona a partir de un cambio conformacional inducido por el efector sobre el sitio alostérico que se transmite finalmente hasta el sitio activo; en otros términos, el sitio de unión al sustrato.

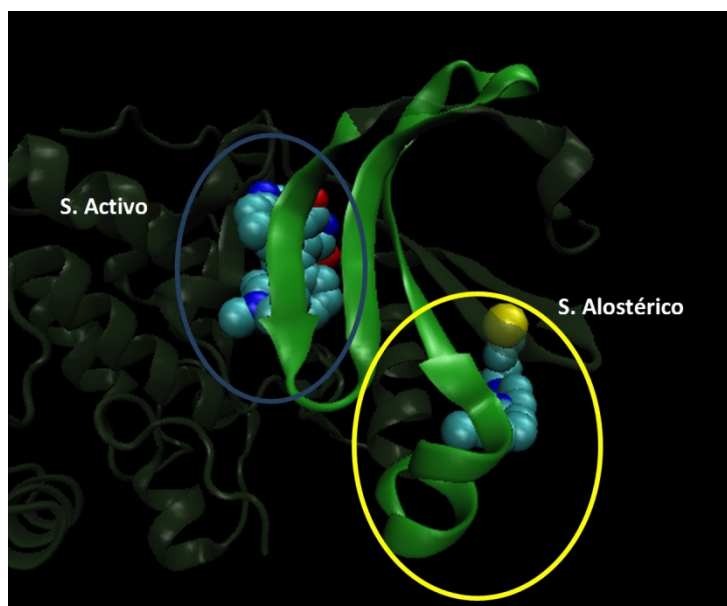


Figura 44: ubicación de el sitio activo (de unión a ATP) y el sitio de regulación alostérica en la enzima PDK1.

Como se muestra en la figura, los sitios de regulación alostérica se encuentran alejados del sitio activo de la enzima.

Uno de los mayores interrogantes en torno a los mecanismos de regulación alostérica es, justamente, el modo en el que se transmiten la señales desde un sitio a otro de la proteína. En resumen, existen clásicamente dos posturas respecto a esto último, una que postula que existe una "fuerza impulsora"^{136,137} (driving force e induced fit) que aporta el ligando, generalmente postulada como una contribución energética por parte del enlace que se forma; y otra que dice que en realidad el efector secuestra conformaciones vibrando a una determinada frecuencia en el paisaje de energía potencial del sistema¹³⁸⁻¹⁴⁰.

En las teorías más modernas respecto a los mecanismos fisicoquímicos subyacentes a la transmisión de la señal alostérica (a decir verdad ya se había insinuado en los trabajos de Lumry y Eyring¹³⁵ en los años cincuenta) se reconoce la necesidad de sitios localmente más desordenados o estructuralmente "defectuosos". En este capítulo daremos nuestra propia interpretación y justificación de todos estos hechos.

Es importante mencionar que los esfuerzos puestos por parte de la comunidad científica en el estudio de mecanismos de regulación alostérica se justifica en el

hecho de que estos modos de regulación presentan enormes ventajas terapéuticas respecto al enfoque tradicional de búsqueda de fármacos competidores por el sitio activo. Los sitios activos de las proteínas se caracterizan por poseer una secuencia muy bien conservada (es decir, casi todos los sitios de unión a ATP están constituidos prácticamente de la misma manera a lo largo de todo el proteoma). Por lo tanto, es muy probable que las drogas que funcionan sobre una proteína blanco también lo hagan sobre muchas otras de la misma manera. Este efecto, a menudo denominado "promiscuidad" farmacológica, termina siendo el causante de gran parte de los efectos secundarios que poseen determinadas drogas. Adicionalmente, la competencia por el sitio activo encarna otro problema: la droga efectora debe tener una afinidad semejante o mayor que el propio ligando natural para ser efectiva, pero esto no siempre es posible, lo que deriva en un aumento de la dosis necesaria para cumplir con la función terapéutica. Más aún, si se llega al diseño óptimo de una molécula potente y selectiva, el efecto que produce suele ser absoluto; es decir, activa o desactiva la función proteica. En contraste con estos hechos, la regulación alostérica, por un lado no necesita desplazar al ligando natural y puede regular la función biológica de una manera progresiva, pero, además, los sitios de unión alostérica suelen ser únicos para cada proteína o, al menos, conservado solo en una determinada familia de proteínas (lo que minimiza los efectos terapéuticos adversos).

Regulación alostérica, binding y el concepto de metaestabilidad productiva inducida por la unión³¹.

En este apartado expondremos, por un lado, una forma novedosa de comprender los mecanismos de regulación alostérica en proteínas quinasas, una breve descripción de las características fisicoquímicas y morfológicas de sus sitios de unión y una mirada integradora sobre estas problemáticas, a la luz de la suma de conceptos que hemos venido discutiendo en el transcurso de la tesis hasta este punto.

En esta primera parte sobre el estudio de proteínas sentaremos las bases para comprender la necesidad de tener en cuenta la naturaleza intrínsecamente

dinámica de estos sistemas, que será, más adelante, puesta de manifiesto más explícitamente.

Metodología

En este primer acercamiento al estudio de proteínas, utilizaremos como punto de partida las estructuras cristalinas de una serie de proteínas quinasas depositadas en el banco de datos del PDB (Protein Data Bank). Para poder completar el estudio de mecanismos como la regulación alostérica, que por definición ilustran la naturaleza dinámicamente cambiante de la estructura enzimática, combinamos el estudio de proteínas "libres" o, más correctamente, apo-proteínas, con la correspondiente observación de las estructuras ligadas al efector alostérico. Este enfoque, si bien solo capta los estados inicial y final del proceso, tiene la ventaja de estar ampliamente validado por la comunidad científica y simplifica el número de consideraciones necesarias para la aceptación de estas mismas observaciones realizadas, por ejemplo, sobre modelados de dinámica molecular. Ya veremos que, sentadas las bases mecánicas probadas en este trabajo, se torna ineludible la necesidad de explorar la dinámica completa de este tipo de sistemas en solución acuosa.

En este trabajo se estudiaron las estructuras libres y acomplejadas de las siguientes proteínas quinasas y sus efectores: c-Kit proto-oncogene protein tyrosine kinase (KIT), interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDK1), RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT1) y cyclin-dependent kinase 2 (CDK2).

Luego, sobre estas interfaces obtenidas experimentalmente, se exploró la presencia de Dehidrones, definidos según los parámetros descritos en la introducción del capítulo. Estudiamos los patrones de arropamiento de cada interfase primero solo intramolecularmente (en el caso de la enzima no ligada) y luego teniendo también en cuenta el aporte de grupos protectores al wrapping local. La identificación de grupos "protectores" entre los átomos del ligando se realizó siguiendo los mismos principios sobre los que fueron definidos en proteínas, es decir, grupos apolares no unidos a átomos sustractores de electrones. Es válido aclarar con antelación, aunque todavía no explicaremos

las razones y consecuencias, que es perfectamente razonable esperar una diferencia en el número de puentes de hidrógeno y también en el grado de arropamiento de los mismos en las interfaces de las dos estructuras cristalinas, aún sin tener en cuenta la presencia de arropadores del ligando. Esto tiene que ver con la propia naturaleza del cambio conformacional necesario para la modificación de la actividad catalítica de la enzima.

Finalmente, en base a la observación de las diferencias encontradas en el patrón de arropamiento de las enzimas libres respecto a las unidas al efector, acuñamos un nuevo concepto denominado metaestabilidad productiva inducida por la unión (o evento PIM por sus siglas en inglés).

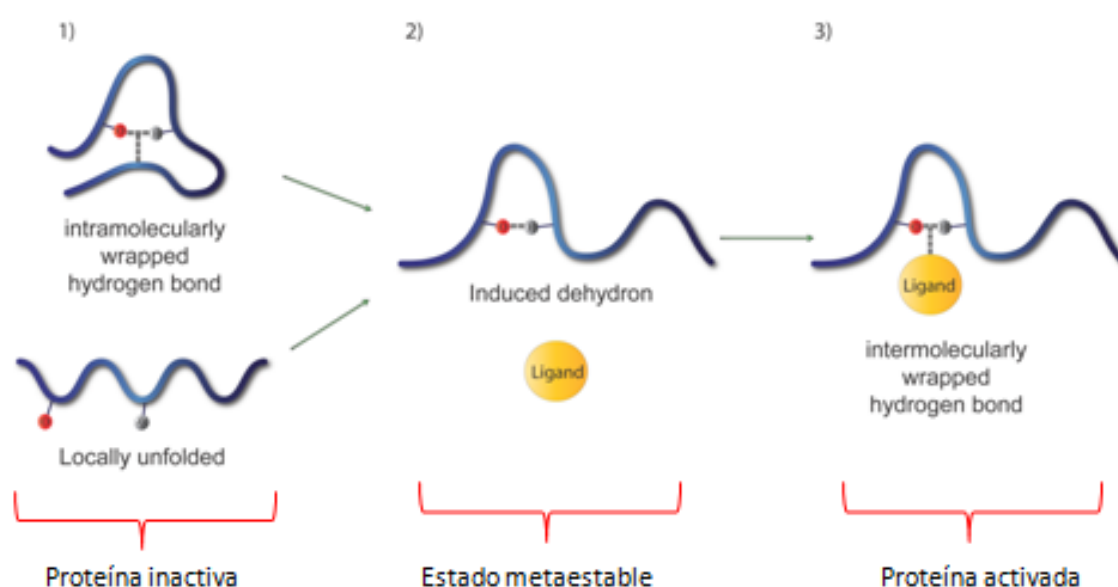


Figura 45: descripción esquemática de la ocurrencia de un evento PIM. (1) Estados estables de la proteína inactiva, caracterizados bien por la presencia de puentes de hidrógeno protegidos intramolecularmente (arriba) o bien por un estado localmente desplegado con átomos potencialmente formadores de puente de hidrógeno expuestos al solvente (abajo). (2) Estado de metaestabilidad inducida, con puentes de hidrógeno parcialmente expuestos al solvente. (3) Proteína reestabilizada en su estado activo, por la protección que brinda el ligando al ataque del agua.

El término PIM se refiere a la presencia de ciertos estados metaestables producidos durante el pasaje de la estructura apo hacia la estructura activada por el efector. Descubrimos que este estado intermedio expone una serie de defectos superficiales hacia el solvente (Dehidrones) que no están presentes ni en la enzima libre ni en el complejo si se tienen en cuenta el aporte protector de los átomos del ligando. En otras palabras, el evento se observa como el pasaje de un estado estable en la apo-proteína, pasando por un estado inestable con Dehidrones expuestos, que, finalmente, son nuevamente estabilizados gracias

al aporte de arropadores por parte del ligando. Es importante mencionar que los defectos transitorios no se encuentran en la enzima libre, bien porque el puente de hidrógeno no se encuentra formado (no forma parte de la estructura más probable del ensamble de configuraciones) o bien porque se encuentra formado y bien protegido (número de arropadores vecinos mayor que el valor de corte para Dehidrones $\rho = 20$).

En resumen, los requisitos que debe tener un puente de hidrógeno para ser considerado un evento PIM son:

- Al considerar los puentes de hidrógeno en la enzima libre (primera columna de las tablas presentadas a continuación) el puente de hidrógeno de interés, bien tiene que presentarse formado y bien protegido ($\rho \geq 20$) o bien ausente en la estructura (marcado con un asterisco). En el primer caso, el sitio cuenta con estabilización entálpica, mientras que en el segundo, la estabilidad se debe a la ganancia entrópica.
- La interacción debe estar presente en el estructura del complejo pero debe presentar un valor de arropamiento tal que lo convierta en Dehidrón ($\rho < 20$) si no se contabilizan los grupos apolares aportados por el ligando.
- Finalmente, el puente de hidrógeno vuelve a ser estable ($\rho \geq 20$) una vez tenido en cuenta el efecto protector del ligando. (tercer columna).

Si se cumplen todos estos requisitos, el puente de hidrógeno forma parte de un evento PIM y se señala en las tablas sombreando de gris la fila correspondiente.

Resultados

Estudio sobre quinasas de mecanismo alostérico DFG-in, DFG-out:

En este apartado estudiaremos el conocido proceso de regulación alostérica por mecanismo DFG. DFG (Asp-Phe-Gly) es una secuencia de aminoácidos bastante conservada en la familia de proteínas quinasas. Esta secuencia, ubicada espacialmente a unos diez angstroms del sitio activo (o sitio de unión a ATP), puede adoptar una conformación cerrada (DFG-out) que impide

estéricamente el posicionamiento de ATP en la región catalítica y una disposición abierta (DFG-in) presente en la enzima activa^{141,142}.

Las proteínas quinasas, muchas de las cuales presentan este tipo de regulación, presentan un enorme interés farmacológico dado que se ha visto que se encuentran desreguladas en muchos procesos relacionados con la biología de ciertos tipos de cáncer^{34,141,142}. Respecto justamente del desarrollo farmacéutico dirigido a terapias anti cáncer, surgieron dos drogas ampliamente utilizadas para la regulación (inhibición) de este tipo de quinasas: SUNITINIB e IMATINIB. Sunitinib fue el primero en ser descubierto e implementado, pero por ser un inhibidor competidor por el sitio activo, presenta casi todos los inconvenientes mencionados en la introducción del capítulo. Imatinib, en cambio, es un inhibidor de tipo II (alostérico) que se une selectivamente a la conformación DFG-out de la enzima, estabilizándola en su estado inactivo. Vale mencionar que el descubrimiento de ambas drogas para el tratamiento del cáncer surge de pruebas de screening molecular (vulgarmente conocidos como "de prueba y error") y no de una orientación de diseño inteligente basado en el conocimiento de los modos de unión y regulación en quinasas¹⁴¹.

A continuación se muestra el estudio del patrón de arropamiento para la interfase del sitio alostérico para la proteína quinasa KIT (c-Kit proto-oncogene protein tyrosine kinase).

En la tabla N°3 (y en todas las posteriores de este apartado) se detallan las características de cada puente de hidrógeno de la interfase, organizados de a uno por fila. La primera columna establece los residuos involucrados en la interacción (nombre y número de residuo en el PDB); la segunda muestra el grado de arropamiento en la proteína apo, siendo p el número de átomos protectores en la esfera de desolvatación del puente de hidrógeno; la tercera columna muestra el p que corresponde a la enzima en su estructura ligada pero sin tener en cuenta el aporte de los grupos apolares del ligando; la cuarta columna completa el estudio del patrón de arropamiento del sitio, una vez tenido en cuenta el aporte del ligando; por último, la quinta columna detalla cuales son los átomos protectores del ligando que participan en la estabilización del sitio. Cabe aclarar que las casillas señaladas con un asterisco "*", indican la ausencia del puente de hidrógeno en la estructura del sitio, esto puede ocurrir por dos motivos: o los residuos están presentes en la estructura

cristalina pero no interactúan, o bien en ausencia del ligando la zona se torna muy flexible y no puede ser resuelta por cristalografía de rayos x.

Hydrogen bond	Apo enzyme	Inhibited enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Leu595–Val603	20	19	22	C1 C6 C20
Gly596–Val603	18	21	22	C20
Val603–Gly596	18	21	22	C20
Val604–Val622	30	26	29	C19 C18 C20
Ala621–Thr670	32	27	31	C5 C19 C18 C20
Val622–Val604	30	26	29	C19 C18 C20
Lys623–Val668	24	25	29	C19 C18 C17 C20
Glu640–Ala636	19	17	19	C28 C29
Val643–Ser639	24	22	23	C28
Leu644–Glu640	23	19	22	C27 C28 C29
Leu647–Val643	27	27	28	C28
Gly648–Leu644	21	16	19	C27 C28 C29
Val654–Ile808	26	23	25	C15 C25
Leu657–Ile669	28	29	32	C19 C18 C20
Gly658–Ile669	*	31	34	C19 C18 C20
Val668–Lys623	24	25	29	C19 C18 C17 C20
Ile669–Gly658	*	31	34	C19 C18 C20
Thr670–Ala621	32	27	31	C5 C19 C18 C20
Gly676–Cys673	*	16	19	C1 C6 C5
Phe681–Asp677	21	23	25	C1 C6
Leu800–Gly676	*	20	23	C1 C6 C5
Ile808–Asn652	*	23	24	C25
Cys809–Asn797	23	19	25	C15 C23 C25 C26 C27 C29
	PDB code	PDB code		
	1PKG	1T46		

Tabla 3: patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Resultados obtenidos para el complejo entre la quinasa KIT y la droga Imatinib.

Es de suponer que en ambos casos la interacción no es suficientemente relevante y por lo tanto no prevalece (una red solida de puente de hidrógeno tendería a rigidizar el sitio haciéndolo "visible" para rayos X). Finalmente, la tabla muestra en "negrita" aquellos valores de ρ que indican la presencia de un

Dehidrón y con sombreado gris aquellos puentes de hidrógeno que participan en un evento PIM.

Como se aprecia en la tabla anterior, el proceso de inhibición alostérica de la droga Imatinib sobre la enzima KIT involucra la ocurrencia de seis eventos de metaestabilidad inducida (PIMs). Se observa también la presencia de los dos tipos de evento: aquellos que involucran el pasaje de un puente de hidrógeno bien constituido en la enzima libre ($\rho \geq 20$) que se desestabiliza en el proceso intermedio ($\rho < 20$) y se vuelve a reforzar con ayuda del ligando (por ejemplo el caso del puente de hidrógeno formado entre LEU525 y VAL603), o bien, aquellos eventos en los que se forma una interacción ausente en la enzima libre (*), inestable en la enzima recortada del ligando in silico ($\rho < 20$), finalmente estabilizada en el complejo (por ejemplo GLY676-CYS673).

Otra observación interesante sobre el comportamiento de Imatinib sobre la proteína es la aparente ineficiencia del ligando para arropar los puentes de hidrógeno de la zona. Es decir, hay regiones donde el evento PIM ocurre, pero no es finalmente estabilizado completamente ya que los valores de ρ continúan por debajo del valor de corte para eliminar el Dehidrón. Se puede suponer entonces que, un proceso de reingeniería de la droga tendiente a maximizar su efecto protector en estas zonas todavía expuestas, puede llegar a redundar en un incremento en su potencial terapéutico.

A continuación se muestra una imagen de la proteína unida a Imatinib, señalando los puentes de hidrógeno involucrados en eventos PIM.

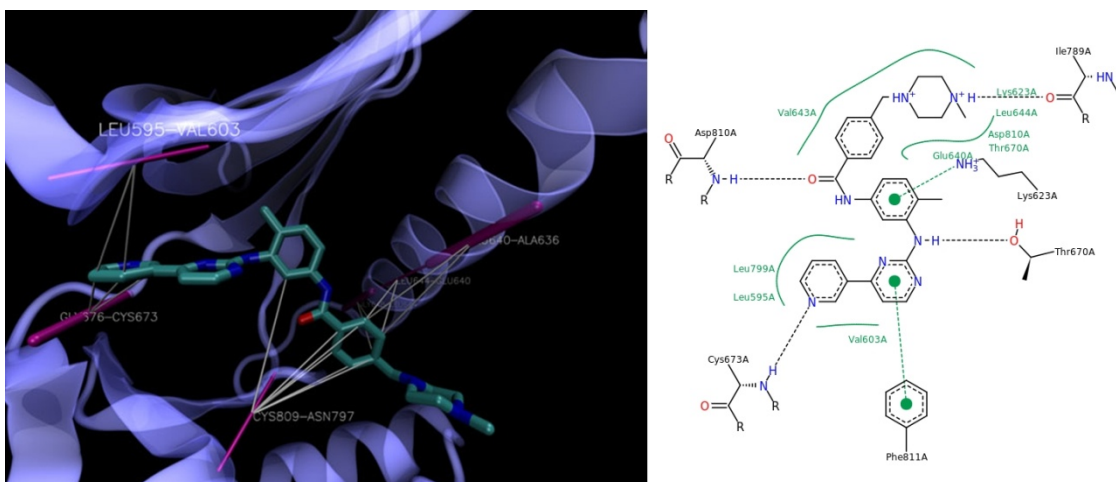


Figura 46: izquierda: diagrama de interacción proteína ligando. Se señalan con barras magentas aquellos puentes de hidrógeno del backbone de la proteína involucrados en eventos PIM; las barras finas indican que el puente de hidrógeno ha sido completamente estabilizado por la droga mientras que las barras gruesas implican que esa interacción es aún defectuosa (Dehidrón). Las líneas blancas desde el ligando hasta la superficie de la proteína señalan el aporte de los átomos

protectores al arropamiento de cada puente de hidrógeno. Derecha: diagrama estándar de interacción entre la proteína y el ligando tal como se muestra en el PDB¹³².

Se muestra además un diagrama donde se señalan las interacciones "típicas" del ligando con la proteína. Se puede notar en ese diagrama que gran parte de la unión suele ser justificada con el término muy general "unión hidrofóbica" (señalada en líneas verdes). Con esta comparación se pretende demostrar que, si bien el efecto hidrofóbico probablemente sea relevante en la energía de binding, cierto es que esos mismos grupos apolares pueden estar formando parte de una interacción biológica y químicamente más relevante. Según la mirada que proponemos, esto se puede entender como una interacción de tres cuerpos (en lugar de las típicamente consideradas interacciones de a pares): un cuerpo hidrofóbico se une por y para reforzar la interacción electrostática central (en este caso de puente de hidrógeno)

En la figura de la izquierda se señalan con barras magentas aquellos puentes de hidrógeno del backbone de la proteína involucrados en eventos PIM; las barras finas indican que el puente de hidrógeno ha sido completamente estabilizado por la droga mientras que las barras gruesas implican que esa interacción es defectuosa (Dehidrón). Por lo tanto, las barras gruesas indican posibles objetivos para el rediseño del medicamento. Finalmente, las líneas blancas desde el ligando hasta la superficie de la proteína señalan el aporte de los átomos protectores sobre cada puente de hidrógeno.

De la imagen precedente se puede inferir que quizás agregando un átomo de carbono en el anillo que protege el puente GLY676-CYS673 y otro en el anillo GLU640-ALA636 es probable que no solo se refuerce el binding sino que se intensifique el efecto regulador.

En contraste con lo mostrado para la inhibición de la enzima KIT, el siguiente caso de estudio corresponde al complejo formado entre la misma droga (Imatinib) con la proteína P38. Se sabe que Imatinib, si bien posee la capacidad de unirse a la enzima, no es una droga efectiva para su regulación^{143,144}. En la tabla puede verse que contrariamente a lo que ocurre en el complejo KIT-Imatinib, en este caso casi no ocurren eventos de metaestabilidad inducida por el ligando. Con la finalidad de no extender esta tesis con información tal vez redundante, se expondrá aquí solo un caso más de estudio sobre regulación de proteínas con el motivo DFG. Se aconseja al lector interesado la lectura del

trabajo "Productive induced metastability in allosteric modulation of kinase function", FEBS J. (2014)³¹, en el que se presenta un análisis más exhaustivo principalmente con el objetivo de validar la metodología empleada.

Hydrogen bond	Apo enzyme	Inhibited enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Cys39–Val52	24	24	26	C19 C20
Ala51–Thr106	24	24	27	C5 C19 C20
Val52–Cys39	24	24	26	C19 C20
Lys53–Leu104	27	29	33	C19 C18 C17 C20
Leu104–Lys53	27	29	33	C19 C18 C17 C20
Val105–Asp88	28	27	30	C19 C18 C20
Thr106–Ala51	24	24	27	C5 C19 C20
Leu108–Arg49	*	18	20	C1 C5
Leu167–Asn155	22	22	28	C15 C23 C25 C27 C28 C29
	PDB code 3PY3	PDB code 3HEC		

Tabla 4: patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Resultados obtenidos para el complejo entre la quinasa P38 y la droga Imatinib.

El último sistema DFG que presentaremos corresponde al complejo formado entre la proteína ITK y la droga Sunitinib (que a diferencia de lo que ocurre con KIT, actúa alostericamente sobre esta proteína¹⁴⁵). En este caso, además de eventos PIM, se puede ver que el ligando actúa arropando también Dehidrones preexistentes en la enzima apo (señalados con barras verdes en la imagen 3D), este tipo de evento también refuerza el binding por las razones explicadas en el desarrollo conceptual que se hizo sobre defectos estructurales de empaquetamiento. Sin embargo, probablemente este tipo de interacción no participe cooperativamente en el proceso alostérico.

Hydrogen bond	Apo enzyme	Inhibited enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Ile369-Val377	14	14	17	C13 C3 C19
Gly370-Val377	*	13	15	C13 C3
Val377-Gly370	12	13	15	C13 C3
Ala389-Phe435	35	34	40	C5 C6 C7 C17 C20 C12
Phe435-Ala389	35	34	40	C5 C6 C7 C17 C20 C12
Glu436-Gln420	22	21	22	C6
Gly441-Met438	*	17	24	C4 C13 C20 C3 C12 C19 C42
Tyr446-Cys442	22	22	25	C13 C3 C12
Val490-Gly441	17	16	23	C4 C13 C20 C3 C12 C19 C42
Ser499-Asn487	*	17	18	C5
	PDB code 1SNX	PDB code 3MIY		

Tabla 5: Patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Resultados obtenidos para el complejo entre la quinasa ITK y la droga Sunitinib.

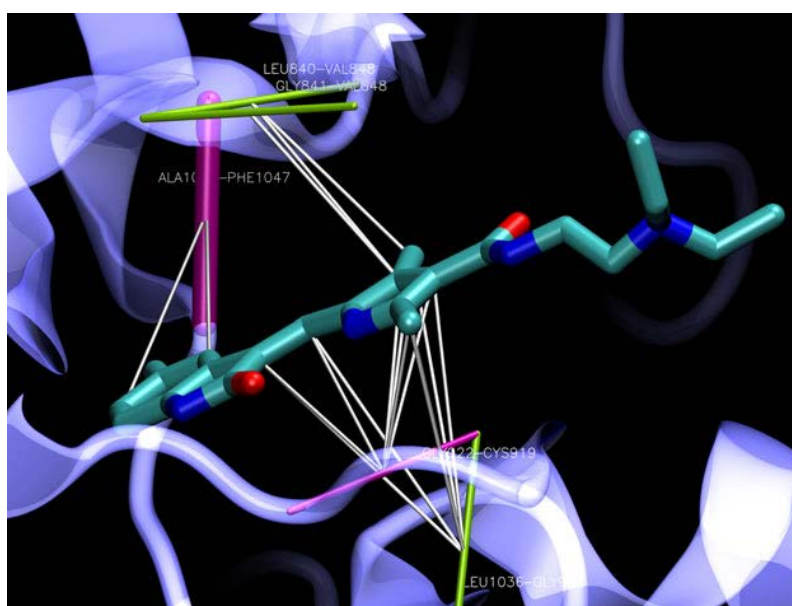


Figura 47: diagrama de interacción proteína ligando. Se señalan con barras magentas aquellos puentes de hidrógeno del backbone de la proteína involucrados en eventos PIM y en verde aquellos Dehidrones preexistentes en la enzima libre; las barras finas indican que el puente de hidrógeno ha sido completamente estabilizado por la droga mientras que las barras gruesas implican que esa interacción es aún defectuosa (Dehidrón). Las líneas blancas desde el ligando hasta la superficie de la proteína señalan el aporte de los átomos protectores al arropamiento de cada puente de hidrógeno.

Análisis sobre quinasas con bolsillo hidrofóbico como sitio de regulación alostérica:

En este apartado se estudiaron las características del mecanismo de regulación alostérica para proteínas quinasas pertenecientes todas a la

subfamilia AGC-quinasas. Este grupo de proteínas, involucrado en importantísimas vías de señalización celular, reviste particular interés para la comunidad científica, puesto que se ha visto que varias de sus proteínas integrantes se encuentran desreguladas en enfermedades tales como cáncer, diabetes, Parkinson, etc¹⁴⁵.

Una característica estructural bien conservada en quinasas AGC es la presencia de un bolsillo hidrofóbico integrado por la denominada hélice alfa que actúa como sitio receptor de señales (alostéricas) y un lóbulo N-terminal que contiene el motivo hidrofóbico que transmite la señal intermolecularmente. En la naturaleza, la cascada de señalización se propaga por fosforilación-desfosforilación mediada por la interacción entre el bolsillo hidrofóbico de una proteína y el extremo hidrofóbico de otra¹⁴⁶. En este trabajo llamaremos PIF-tide¹⁴⁵ o fragmento de interacción proteica al extremo terminal (de la traducción de las siglas en inglés) y PIF-pocket^{147,148} al bolsillo hidrofóbico que oficia de sitio de unión. Si bien esta nomenclatura fue acuñada originalmente para las proteínas PKA y PDK-1 respectivamente, ya aparece en la bibliografía extendida al resto de las quinasas de la familia AGC^{146,149}.

Aunque con variaciones según el par de proteínas intervinientes, las características químicas y topológicas de la unión alostérica se pueden generalizar de la siguiente manera: la interacción central entre el PIF-tide y el PIF-pocket es un puente salino que se establece entre un residuo cargado negativamente en el PIF-tide (bien un ácido aspártico o bien una treonina fosforilada) y un residuo cargado positivamente en el bolsillo hidrofóbico (arginina); adicionalmente, ambos fragmentos contienen cadenas laterales aminoacídicas apolares flanqueando la interacción entre cargas, particularmente dos fenilalaninas en el fragmento PIF-tide. Si recordamos la discusión en capítulos precedentes respecto de la relación entre hidrofobicidad y geometría, sabemos que es válido mencionar que, más allá de los fragmentos hidrofóbicos presentes en el PIF-pocket, la propia geometría del sitio (una cavidad) puede ser también relevante para la exclusión de agua y la energía de unión.

Antes de continuar con la presentación de resultados, solo cabe mencionar que el bolsillo hidrofóbico se encuentra en una zona distal al sitio activo (o de unión a ATP), pero conectado al mismo compartiendo el reverso de una hélice alfa.

Estudios realizados por el grupo del profesor Biondi^{147,148,150} demostraron que, no solo la unión a sus ligandos naturales sino también a pequeñas moléculas que los imitan, ejercen un efecto en el PIF-poquet que se transmite por la proteína, modulando su capacidad por unir ATP. En este apartado del trabajo mostraremos tanto proteínas unidas a su efector natural (proteína ciclina A con quinasa CDK2), complejos entre una proteína receptora con solo el fragmento PIF-tide recortado in silico (AKT1 o AKT2 con el fragmento peptídico activador PIF-tide) y finalmente enzimas con drogas que emulan la acción del fragmento natural (por ejemplo PDK-1 con la droga 2A2 o ps-171^{150,151}).

Complejo entre ciclina A y la proteína quinasa CDK2:

Hydrogen bond	Apo enzyme	Activated enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Glu40–Asp38	*	12	18	CB CG CD CB CG CD2
Glu42–Asp38	*	11	16	CB CG2 CG CD1 CD2
Gly43–Asp38	*	13	19	CG2 CB CG CD1 CD2 CG
Ile49–PRO45	20	17	22	CD CD1 CE1 CZ CD1
Arg50–Ser46	15	16	22	CB CG CD CG CD1 CE1
Ile52–Ala48	27	29	33	CB CG CD1 CE1
Ser53–Ile49	24	20	30	CE1 CB CG CD1 CE1 CZ CB CG CD1 CB
Leu54–Arg50	18	20	24	CG CD1 CE1 CB
Lys56–Ile52	*	21	25	CB CG CD1 CE1
Glu57–Leu54	15	15	17	CE1 CB
	PDB code	PDB code		
	1PW2	1FIN		

Tabla 6: patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Resultados obtenidos para el complejo proteico entre la quinasa CDK2 y la proteína ciclina A.

Como puede notarse en la tabla, ocurren cuatro eventos PIM más el arropamiento de un Dehidrón preexistente en la estructura apo. Una característica importante de esta interfase es la formación de tres nuevos puentes de hidrógeno ausentes en la estructura libre, con un grado de desprotección muy alto (ρ entre 11 y 13) que, si bien no son completamente estabilizados (ρ continua por debajo de 20), ganan entre cinco y seis grupos protectores una vez establecido el complejo. En este caso en particular, puede

que el resto del cuerpo de la proteína ligada este contribuyendo también a oclusión de solvente (aunque esto no es considerado en nuestros estudios).

AKT1 unido al péptido activador PIF-tide:

Hydrogen bond	Apo enzyme	Activated enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Leu181–Leu223	22	20	24	CE1-472 CZ-472 CE2-472 CD2-472
Lys183–Asp221	21	18	22	CB-466 CG-466 CE1-469 CZ469
Val187–Lys183	*	17	20	CG-466 CE1-469 CZ-469
Ala188–Glu184	*	13	16	CB-465 CG-465 CG-466
Leu196–Val192	*	18	23	CZ-469 CE2-469 CD2-469 CD1-472 CE1-472
Asn199–Thr195	*	24	27	CD1-472 CE1-472 CZ-472
Arg200–Leu196	*	17	19	CD1-472 CE1-472
Gln203–Asn199	*	18	26	CD1-472 CE1-472 CZ-472 CG-474 CD1-474 CE1-474 CE2-474 CD2-474
Lys214–Val226	*	23	26	CE2-474 CD2-474 CB-476
Tyr215–Val226	25	24	28	CB-474 CG-474 CE2-474 CD2-474
Phe217–Cys224	*	19	24	CG-472 CZ-472 CE2-472 CD2-472 CB-473
Leu223–Leu181	22	20	24	CE1-472 CZ-472 CE2-472 CD2-472
Cys224–Phe217	24	19	24	CG-472 CZ-472 CE2-472 CD2-472 CB-473
Val226–Tyr215	25	24	28	CB-474 CG-474 CE2-474 CD2-474
	PDB code	PDB code		
	3O96	4EKK		

Tabla 7: patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Resultados correspondientes al estudio del complejo entre la quinasa AKT1 y su péptido activador alostérico (PIF-tide).

El ejemplo de unión entre AKT1 (Similar en AKT2, ver cita³¹) y su péptido activador resulta muy revelador de la potencia con que los conceptos que estamos estudiando ocurren en la naturaleza. En este caso, detectamos ocho eventos de metaestabilidad inducida por la unión del péptido (notar además que se trata de una interfase muy similar a la de otros bolsillos hidrofóbicos de la misma familia). Puede verse, además, que ocurren los dos tipos de eventos PIM, tanto la formación de nuevos puentes de hidrógeno que resultarían

inestables sin la tutela del ligando, como eventos en los que un puente de hidrógeno se desestabiliza y vuelve a establecerse una vez incluido el péptido.

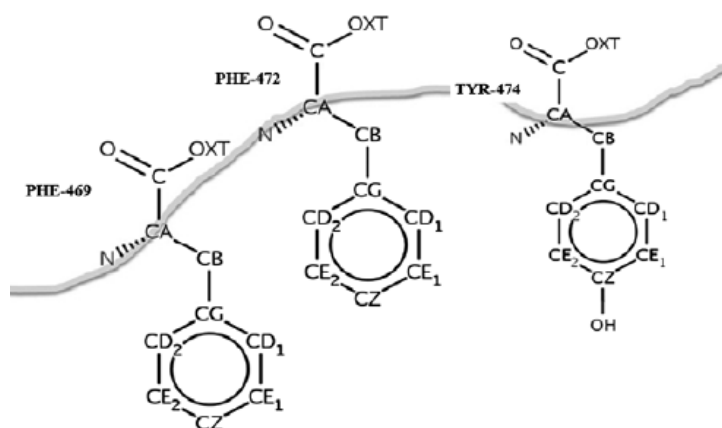


Figura 48: representación esquemática del péptido activador de PDK1 con énfasis en los residuos de mayor relevancia como protectores de la interfase (con la nomenclatura atómica utilizada en el PDB y en la tabla 7)

Regulación de PDK1 con pequeñas moléculas sintéticas:

Más allá de lo observado sobre el mecanismo natural de binding y regulación alostérica, en este apartado veremos cómo, basadas en los mismos principios de funcionamiento que el ligando natural, pueden diseñarse pequeñas moléculas de interés farmacológico.

En este sentido, se eligió el trabajo experimental realizado por el Dr. Biondi, en el que se proponen una serie de compuestos con probada eficacia para la regulación de la enzima PDK1^{147,148,150,151} como punto de partida para poner a prueba nuestros métodos teóricos. En los trabajos de Biondi, se explica que el funcionamiento de estos moduladores sintéticos (y también su diseño) se sustenta en la capacidad que tienen estas moléculas por imitar la forma y la química de su equivalente natural. Como se puede apreciar en los diagramas que se muestran a continuación, todas las moléculas que presentan actividad sobre la proteína poseen una carga central (un carboxilato que imita la cadena lateral del ácido aspártico en el PIF-tide) flanqueado por dos anillos bencénicos equivalentes a las cadenas laterales de las fenilalaninas del péptido natural. Las estructuras cristalinas tanto de la enzima libre como de los complejos también fueron tomadas del trabajo del mismo grupo de investigación.

Hydrogen bond	Apo enzyme	Activated enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Lys115–Glu153	23	20	23	C27 C28 C30
Ile119–Lys115	21	16	19	C27 C28 C30
Asn122–Ile119	16	15	16	C28
Thr128–Val124	19	19	20	C30
	PDB code	PDB code		
	1H1W	3ORZ		

Hydrogen bond	Apo enzyme	Activated enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Leu113–Leu155	27	25	28	C17 C16 C14
Lys115–Glu153	23	22	23	C6
Ile119–Lys115	21	19	20	C6
Thr128–Val124	19	20	23	C6 C14 C13
Arg131–Val127	23	22	23	C14
Asp132–Thr128	14	13	15	C14 C13
Ser135–Arg131	16	16	17	C14
Phe149–Tyr156	30	29	31	C17 C16
Leu155–Leu113	27	25	28	C17 C16 C14
Tyr156–Phe149	30	29	31	C17 C16
	PDB code	PDB code		
	1H1W	4A07		

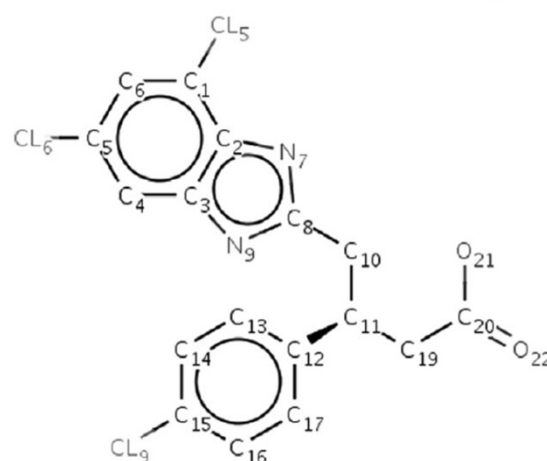
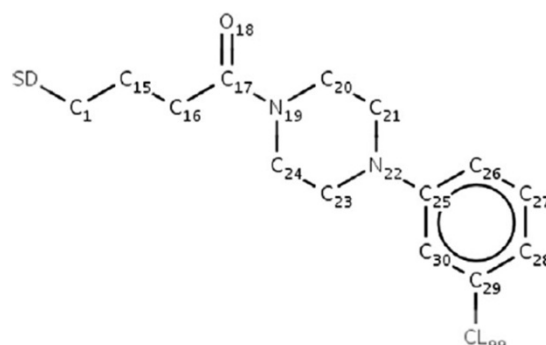


Tabla 8: patrones de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase de la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Derecha: diagramas de los ligandos considerados en el estudio. Resultados para los complejos entre la proteína quinasa PDK1 y los efectores alostéricos 2A2 (arriba) y PS-171 (abajo)¹⁵¹.

Si bien era importante para la conclusión de este estudio sobre el reconocimiento de motivos de binding y mecanismos de regulación alostérica presentar ejemplos aplicados al diseño de drogas, nos llama por supuesto la atención la escasa presencia de eventos PIM en estos últimos casos. Esto sobre todo, teniendo en cuenta que la interfase de la enzima PDK1 contiene prácticamente la misma secuencia de aminoácidos que las demás quinasas AGC ensayadas, que la topología del complejo es también muy similar y que el ligando se puede ver en la estructura cristalina del complejo, ocupando los mismos sitios que se observan para el PIF-tide.

Sin embargo, este comportamiento inesperado en base a nuestras predicciones, puede ser explicado a partir de algunos defectos en la obtención de la estructura cristalina de la enzima libre. En el artículo donde se presenta esta estructura cristalina los mismos autores sugieren que la enzima podría estar artificialmente más "ordenada" en la zona del PIF-pocket que lo que cabe

esperar¹⁴⁸. Más aún, en trabajos posteriores¹⁵¹ (en el material suplementario del artículo) se muestra un escrutinio más riguroso sobre estas suposiciones que demuestra que efectivamente la estructura real de la proteína debe ser mucho más flexible que lo que se ve en la cristalografía (por ejemplo mediante experimento de intercambio de deuterio). De manera interesante, los autores atribuyen el defecto en el cristal a la posibilidad de que la zona N-terminal de una molécula se esté empaquetado unida a la zona del bolsillo hidrofóbico de otra idéntica, de alguna manera "estabilizando" una conformación más rígida (sic).

Si examinamos lo que ocurre con nuestro análisis, a la luz de estas nuevas observaciones, podemos inferir que, en realidad, la estructura que estuvimos analizando como apo-proteína sea demasiado parecida a la estructura de la proteína acomplejada. De hecho, de ser cierta la hipótesis de una asociación PDK1-PDK1 propuesta por Biondi, dado que la proteína cuenta con los dos extremos necesarios para la regulación (PIF-tide y PIF-pocket), la estructura obtenida debería ser justamente la del complejo activado y, por lo tanto, los eventos PIM ya habrían sido consumados.

Lamentablemente para corroborar esta serie de hipótesis deberíamos contar con la estructura cristalina de la enzima libre obtenida en condiciones más apropiadas, pero hasta el momento de realizada esta tesis no existe tal estructura en el PDB.

Análisis de eventos PIM como método para la reingeniería de drogas:

Para terminar de ilustrar las posibilidades de aplicación de este enfoque novedoso sobre los mecanismos de regulación de proteínas, se exhibe a continuación la comparación entre dos moléculas muy similares sobre la actividad de la enzima KIT.

Dado que la actividad y la estabilidad en proteínas en su estado acomplejado no se debe, por supuesto, solo a la presencia de eventos PIM, la determinación del poder predictivo de su cuantificación no es sencilla de realizar. De hecho, es esperable que, tanto la identidad de la proteína, como el tamaño y la química de los efectores, pueda condicionar los resultados. En esta sección, sin embargo, analizaremos el caso de la reingeniería de Imatinib en dos nuevos compuestos WBZ_4 y WBZ_7^{152,153}, ambos creados a partir de la adición de un

solo grupo metilo a la molécula original. La posibilidad de comparar el efecto de dos moléculas tan similares, cuya diferencia en actividad ha sido medida experimentalmente, constituye el marco ideal para probar el poder predictivo del rediseño de drogas basado en eventos PIM.

Estudio de caso WBZ_4:

WBZ_4 es una molécula rediseñada a partir de Imatinib con el objetivo de disminuir su cardiotoxicidad (disminuyendo su afinidad por la quinasa Abl) y potenciar su actividad reguladora sobre la enzima KIT. En los estudios realizados por el grupo del Prof. Fernández, se ha reportado que por la adición de un grupo metilo unido al C2 de Imatinib, se puede conseguir un incremento del 23% en la afinidad de binding sobre c-KIT¹⁵³. Resulta pertinente mencionar que el proceso involucrado en el rediseño de Imatinib, en ausencia de la noción de eventos PIM, fue conducida con el objetivo de inactivar Dehidrones presentes en la interfase reportada en el PDB para el complejo KIT-IMATINIB, es decir, en este proceso no se tuvo en cuenta a la enzima libre como target (la practica más frecuente).

Dada la falta de estructuras cristalinas para el complejo entre la proteína y las drogas rediseñadas, para el análisis de eventos PIM en la interfase se procedió a realizar la modificación *in silico* del ligando a partir de la estructura cristalina KIT-Imatinib. De todos modos, esta es una aproximación razonable, teniendo en cuenta la enorme similitud entre los compuestos.

Si se comparan los resultados mostrados anteriormente para el proceso de inhibición del fármaco original (ver tabla N°3) con lo obtenido para WBZ_4, puede verse que el carbono C30 agregado (resaltado en negrita en la tabla) actúa protegiendo uno de los puentes de hidrógeno que Imatinib arroja subóptimamente. Lo interesante de este caso de estudio es que, justamente este puente de hidrógeno favorecido con la modificación de la droga, está envuelto en uno de los eventos PIM que se producen en la inhibición; es decir, al menos en este caso, podemos asegurar que, en ausencia de otros motivos de unión, toda la diferencia en la energía de binding se puede atribuir a la reestabilización de eventos de metaestabilidad.

Hydrogen bond	Apo enzyme	Inhibited enzyme		Wrappers in ligand
	ρ	ρ without ligand	ρ with ligand	
Leu595-Val603	20	19	22	C1 C6 C20
Gly596-Val603	18	21	22	C20
Val603-Gly596	18	21	22	C20
Val604-Val622	30	26	29	C19 C18 C20
Ala621-Thr670	32	27	31	C5 C19 C18 C20
Val622-Val604	30	26	29	C19 C18 C20
Lys623-Val668	24	25	29	C19 C18 C17 C20
Glu640-Ala636	19	17	19	C28 C29
Val643-Ser639	24	22	23	C28
Leu644-Glu640	23	19	22	C27 C28 C29
Leu647-Val643	27	27	28	C28
Gly648-Leu644	21	16	19	C27 C28 C29
Val654-Ile808	26	23	25	C15 C25
Leu657-Ile669	28	29	32	C19 C18 C20
Gly658-Ile669	*	31	34	C19 C18 C20
Val668-Lys623	24	25	29	C19 C18 C17 C20
Ile669-Gly658	*	31	34	C19 C18 C20
Thr670-Ala621	32	27	31	C5 C19 C18 C20
Tyr 675-Leu800	25	24	25	C30
Gly676-Cys673	*	16	20	C1 C6 C5 C30
Phe681-Asp 677	21	23	25	C1 C6
Leu800-Gly676	*	20	24	C1 C6 C5 C30
Ile808-Asn652	*	23	24	C25
Cys809-Asn797	23	19	25	C15 C23 C25 C26 C27 C29
	PDB code 1PKG	PDB code 1T46^a		

Tabla 9: patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Estudio del complejo entre la proteína quinasa KIT y la droga WBZ_4. En negrita se indica el átomo de carbono adicionado en el proceso de reingeniería.

Caso número dos: diseño de WBZ_7:

El objetivo de rediseño de Imatinib en WBZ_7 es ligeramente diferente que lo explicado para WBZ_4. Una de las debilidades terapéuticas más importantes de Imatinib es que, en determinadas ocasiones, se desarrolla una resistencia natural a su actividad sobre KIT. Se sabe, además, que esta resistencia radica en la mutación de un residuo en la proteína blanco (D816V)¹⁵². Si bien no existe una explicación concreta en la bibliografía que justifique la pérdida de afinidad entre KIT e Imatinib a partir de esta mutación, desde nuestra perspectiva esto puede ser explicado por la formación de un nuevo evento PIM que no puede ser estabilizado por la molécula original. La diferencia fundamental entre el residuo de valina original y el ácido aspártico en la proteína mutada es su capacidad por proteger las interacciones vecinas del ataque del agua. Mientras que la cadena lateral de valina posee tres átomos apolares, el ácido aspártico no solo no posee ninguno sino que, además, incorpora una carga en el sitio.

Como puede verse en las tablas a continuación, este nuevo defecto de empaquetamiento devenido de la mutación D816V no puede ser apropiadamente desactivado por Imatinib, mientras que el átomo adicional en WBZ_7 (C31 en negrita) se posiciona justamente en la vecindad de esa interacción, elevando su grado de arropamiento por encima del límite que lo clasificaría como Dehidrón.

Hydrogen bond	Apo enzyme		Imatinib		Wrappers in ligand
	ρ		ρ without ligand	ρ with ligand	
Leu595-Val603	20		19	22	C1 C6 C20
Gly596-Val603	18		21	22	C20
Val603-Gly596	18		21	22	C20
Val604-Val622	30		26	29	C19 C18 C20
Ala621-Thr670	32		27	31	C5 C19 C18 C20
Val622-Val604	30		26	29	C19 C18 C20
Lys623-Val668	24		25	29	C19 C18 C17 C20
Glu640-Ala636	19		17	19	C28 C29
Val643-Ser639	24		22	23	C28
Leu644-Glu640	23		19	22	C27 C28 C29
Leu647-Val643	27		27	28	C28
Gly648-Leu644	21		16	19	C27 C28 C29
Val654-Ile808	26		23	25	C15 C25
Leu657-Ile669	28		29	32	C19 C18 C20
Gly658-Ile669	*		31	34	C19 C18 C20
Val668-Lys623	24		25	29	C19 C18 C17 C20
Ile669-Gly658	*		31	34	C19 C18 C20
Thr670-Ala621	32		27	31	C5 C19 C18 C20
Gly676-Cys673	*		16	19	C1 C6 C5
Phe681-Asp 677	21		23	25	C1 C6
Leu800-Gly676	*		20	23	C1 C6 C5
Ile808-Asn652	*		23	24	C25
Cys809-Asn797	23		19	25	C15 C23 C25 C26 C27 C29
		PDB code 1PKG D816V ^a		PDB code 1T46 D816V ^a	

Hydrogen bond	Apo enzyme		WBZ_7		Wrappers in ligand
	ρ		ρ without ligand	ρ with ligand	
Leu595-Val603	20		19	23	C1 C6 C20 C31
Gly596-Val603	18		21	23	C20 C31
Val603-Gly596	18		21	23	C20 C31
Val604-Val622	30		26	29	C19 C18 C20
Ala621-Thr670	32		27	31	C5 C19 C18 C20
Val622-Val604	30		26	29	C19 C18 C20
Lys623-Val668	24		25	29	C19 C18 C17 C20
Glu640-Ala636	19		17	19	C28 C29
Val643-Ser639	24		22	23	C28
Leu644-Glu640	23		19	22	C27 C28 C29
Leu647-Val643	27		27	28	C28
Gly648-Leu644	21		16	19	C27 C28 C29
Val654-Ile808	26		23	25	C15 C25
Leu657-Ile669	28		29	32	C19 C18 C20
Gly658-Ile669	*		31	34	C19 C18 C20
Val668-Lys623	24		25	29	C19 C18 C17 C20
Ile669-Gly658	*		31	34	C19 C18 C20
Thr670-Ala621	32		27	31	C5 C19 C18 C20
Gly676-Cys673	*		16	19	C1 C6 C5
Phe681-Asp 677	21		23	25	C1 C6
Leu800-Gly676	*		20	23	C1 C6 C5
Ile808-Asn652	*		23	24	C25
Cys809-Asn797	23		19	25	C15 C23 C25 C26 C27 C29
Ala814-Phe811	*		17	18	C31
		PDB code 1PKG D816V ^a		PDB code 1T46 D816V ^a	

Tabla 10: patrón de arropamiento de puentes de hidrógeno en la interfase para la proteína libre (segunda columna), la enzima activa sin contar con el efecto protector del ligando (tercera columna) y para la proteína finalmente unida al ligando (cuarta columna). Con sombreado gris se indican las interacciones involucradas en eventos PIM. En negrita se indican los puentes de hidrógeno subóptimos (Dehidrones). Estudio del complejo entre la quinasa KIT mutada (D816V) y las drogas Imatinib (arriba) y WBZ_7 (abajo). En negrita se indica el átomo de carbono adicional en el proceso de reingeniería.

Conclusiones y discusión sobre el estudio de eventos PIM en proteínas quinasas.

En lo que va del capítulo, hemos aprendido que la química de proteínas funciona en un delicado equilibrio de estados que se debaten entre un lado y otro de la delgada línea termodinámica que separa actividad de inactividad; estabilidad de desnaturalización, afinidad de resistencia química, etc.

Hemos propuesto en este primer estudio un método de racionalizar los procesos de regulación alostérica y binding de efectores basado en la formación de inestabilidades transitorias (compatible con la noción de "defectos móviles" propuesta por Lumry y Eyring) en la interfase proteica. El concepto de "evento de metaestabilidad inducida productivamente" o PIM implica entonces la necesidad de un estado energéticamente menos favorable que la enzima libre para producir el efecto potenciador-inhibidor de la actividad. Precisamente este estado "defectuoso", con todos los elementos estructurales necesarios para modificar la actividad enzimática, se vuelve más reactivo a aquellos ligandos con la capacidad de proteger las interacciones vulnerables del ataque del solvente. Según las pruebas que hemos recabado a lo largo de este trabajo, el mecanismo de regulación alostérica se puede resumir finalmente en el paso de una estructura estable con una dada actividad biológica, a una estructura localmente defectuosa con alta afinidad por ligandos protectores, y finalmente a una nueva estructura estable, sostenida por el aporte protector del ligando, que presenta una variación en su actividad biológica. Finalmente, estos hallazgos parecen ser más compatibles con la teoría que predice que la estructura alostericamente regulada de la proteína ya existe en el ensamble de estructuras disponibles dinámicamente, pero con baja probabilidad de ocurrencia. El ligando entonces ejerce su efecto regulador aumentando la probabilidad de ocurrencia de esta estructura y no tanto proveyendo una "fuerza impulsora" ("drivingforce") que lleve a la proteína a cambiar de estado.

Cabe aclarar, sobre todo para el lector no del todo familiarizado con el trabajo del profesor Fernández, que el verdadero efecto potenciador de la energía de unión entre la proteína y el ligando es la presencia de Dehidrones (tanto preexistentes en la enzima libre como involucrados en eventos PIM). La ocurrencia de eventos PIM, por otro lado, está más relacionada con la

repercusión de esa unión sobre la actividad de la enzima. En simples palabras, arrojar un Dehidrón siempre mejora el binding, mientras que arrojar un Dehidrón que forma parte de un evento PIM es el verdadero motivo del efecto regulador de un ligando alostérico.

En este punto es útil discutir también la relevancia de estos conceptos sobre la caracterización de hot spots y motivos de unión. Como se introdujo al comienzo de este capítulo, el efecto del solvente sobre las interacciones en sistemas biológicos es uno de los aspectos que afectan al binding más olvidados por parte de la comunidad científica (o más incomprendidos). Hemos demostrado aquí que gran parte de la energía de unión se debe, justamente, a la capacidad del ligando por ocluir solvente en la interfase y como eso redundante en una ganancia energética en el complejo proveniente del refuerzo de algunos puentes de hidrógeno sobreexpuestos del backbone de la proteína. Sin embargo, es importante recordar que, por supuesto, existen otras interacciones muy relevantes para el binding, más allá de la protección de Dehidrones. Particularmente no hemos considerado hasta ahora la presencia de interacciones inter-moleculares tradicionales, por ejemplo, interacciones de cargas y puentes salinos.

Ya hemos analizado en el capítulo cuatro la importancia del entorno dieléctrico local para las interacciones electrostáticas entre superficies con carga formal. También hemos probado que esto es válido para la estabilización de puentes de hidrógeno intramoleculares de la proteína. Dado que se trata en todos los casos del mismo concepto, es de esperar que el modulado de interacciones intermoleculares del tipo puente salino (o incluso puente de hidrógeno) también juegue un rol importante en la unión y reconocimiento molecular en sistemas biológicos. De hecho, sobre el bolsillo hidrofóbico (PIF-pocket) de las quinasas que hemos estado estudiando, se conserva una interacción entre cargas opuestas en la proteína y el ligando sin la cual no ocurre la unión¹⁵¹. Lo más interesante, sin embargo, es que no solo son esenciales los residuos cargados, sino que la ausencia de grupos apolares a su alrededor también repercute negativamente sobre la formación del complejo (muy razonable si se recuerda la discusión del capítulo anterior).

Corresponde decir sobre este caso, que si bien fue uno de los motivos impulsores de toda la investigación presentada en el capítulo cuatro, no pudo

incorporarse su estudio detallado y sistemático dentro de los límites temporales previstos para el doctorado. Sin embargo, como puede verse en la figura, este sitio en particular, combina todos los factores que sabemos que contribuyen al modulado local del solvente y, por lo tanto, de la interacción de cargas: gran curvatura local y grupos químicos apolares. Un estudio completo de los mecanismos de binding en este tipo de quinasas debería incluir, más allá del criterio de protección de defectos locales en la estructura ya discutido, un análisis completo de la relevancia de la curvatura y la química en el entorno del puente salino.

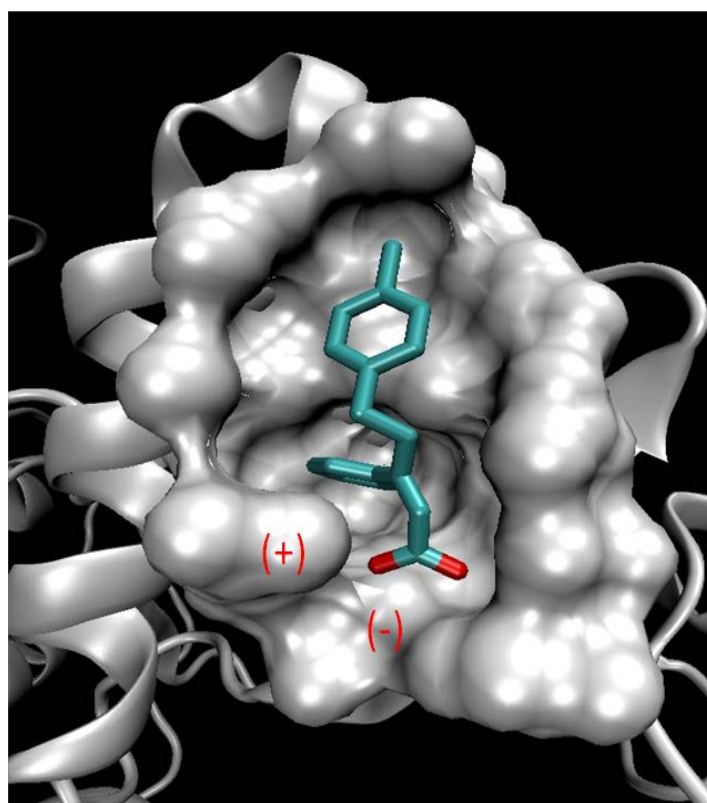


Figura 49: interacciones electrostáticas (cargas en rojo) en el entorno hidrofóbico (por motivos químicos y geométricos, ver cap. 4) del bolsillo de alosterico de la enzima PDK1.

Finalmente, este trabajo nos plantea una consideración adicional al tratamiento tradicionalmente utilizado para evaluar mecanismos de binding en proteínas: la estructura cristalina de la proteína libre puede no ser el objeto de estudio adecuado. Como hemos podido ver hasta aquí, parte de la información necesaria para comprender el mecanismos de unión (al menos) en proteínas quinasas se encuentra en la dinámica de su estructura, puesto que la mayor parte de los motivos de unión observados en los complejos proteína-ligando

estudiados no pueden ser predichos a partir de la observación de la apo-proteína.

Aspectos dinámicos del mecanismo de unión de proteínas.

Las proteínas son objetos inherentemente dinámicos, por lo tanto, y según lo discutido en la sección anterior, el hecho de considerar cada interacción no covalente que en ella ocurren de manera binaria (formada o no formada), puede estar velando información realmente relevante para la comprensión de sus características fisicoquímicas. Específicamente, se puede encontrar a menudo el caso de interacciones por puente de hidrógeno presentes en la estructura reportada para una dada proteína en el PDB, con un peso insignificante en el ensamble de estructuras visitadas en la dinámica y, su contraria, puentes de hidrógeno ausentes en el PDB pero con una persistencia dinámica importante. Recientes estudios realizados por el grupo de investigación que integro demuestran que, en particular estos puentes de hidrógeno con mayor variación entre la dinámica y la estructura cristalina, se encuentran principalmente concentrados en las zonas de binding³².

El trabajo antes citado puede considerarse como la extensión natural de los conceptos aprendidos en el estudio de eventos PIM. De hecho, su contribución principal es la capacidad de detectar estos puentes de hidrógeno denominados "camaleónicos" (ya veremos que son equivalentes a aquellos involucrados en eventos PIM) por medio de dinámica molecular, sin la necesidad de contar con la estructura cristalina del complejo receptor-ligando. Esto permite el diseño de drogas para regular proteínas para las cuales aún no se ha encontrado un ligando efectivo.

Propensión dinámica de puentes de hidrógeno

Para comprender la propensión dinámica de un puente de hidrógeno a permanecer formado o desaparecer en solución puede computarse la denominada matriz de distancia de puentes de hidrógeno. Esta matriz se construye calculando la fracción del tiempo de la dinámica molecular en la que puede observarse el puente formado. Es decir, se determina la ocurrencia o no de la interacción a cada tiempo de evaluación para cada elemento de la matriz

(siendo 1 para el puente formado y 0 en caso contrario). Luego se promedian los valores para cada elemento de la matriz en el tiempo total de simulación y, por lo tanto, la matriz final contiene valores entre 0 (interacción nunca formada) y 1 (formada todo el tiempo) para cada elemento considerado.

En el artículo recientemente publicado por nuestro grupo (Menéndez y colaboradores) se muestra, por un lado, que los puentes de hidrógeno muy estables en la dinámica de la proteína se encuentran prácticamente "secos", mientras que los menos estables se encuentran expuestos al solvente; además, se reporta que la población de puentes de hidrógeno inestables se reduce grandemente luego de la formación de complejos proteína-ligando.

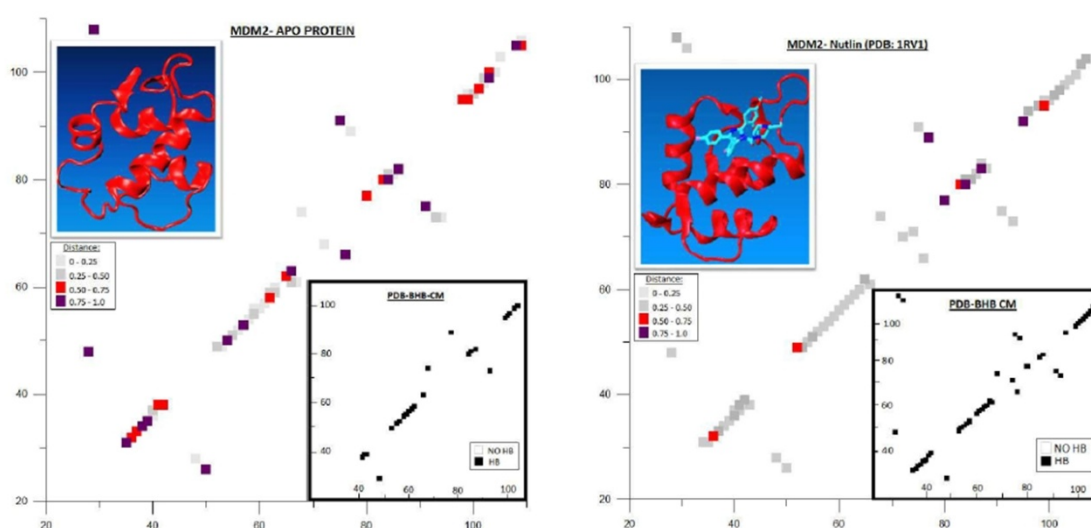


Figura 50: izquierda: matriz de distancia correspondiente al sitio activo de la proteína libre MDM2. derecha: ídem anterior, pero para el complejo MDM2-Nutlin3.

Otro resultado sobresaliente del mismo artículo, de suma relevancia para los temas tratados en este capítulo, explora la relación que existe entre la información suministrada en la estructura cristalina de una proteína y su comportamiento dinámico en solución. Con este objetivo se confeccionó una nueva matriz (D) que recopila las distancias entre la matriz de puentes de hidrógeno obtenida de la dinámica y su equivalente del PDB (constituida por solo 1 o 0 para cada elemento). Lo interesante de este estudio es que es una medida dinámica, pero equivalente a la detección de eventos PIM: un alto valor de D implica la presencia de una interacción, o que no estaba en la estructura cristalina y aparece contundentemente en la dinámica, o una interacción establecida en el cristal pero sin relevancia en la dinámica. Es decir, es esperable que aquellas interacciones que presentan un mayor valor de D, concuerden con aquellas involucradas en eventos de metaestabilidad inducida.

En la figura se muestra en colores rojo y violeta aquellos puentes de hidrógeno con mayor valor de D en la proteína y en grises aquellos con mayor similitud entre el PDB y la dinámica (se muestran como ejemplo los resultados para MDM2-apo y MDM2 con el inhibidor nutlin³²). Dos cosas pueden verse claramente en la figura: primero que los puentes de hidrógeno con mayor diferencia se encuentran en la zona de interacción de ligandos y segundo que estas diferencias son mucho menores cuando en lugar de la proteína libre se examina el comportamiento del complejo. Esto quiere decir que el ligando actúa de alguna manera estabilizando una estructura preferencial, que luego no varía demasiado en la dinámica en solución. En definitiva, estas observaciones pueden ser explicadas si se tiene en cuenta una de las afirmaciones iniciales del trabajo de Menéndez respecto de la relación entre la propensión dinámica de puentes de hidrógeno y el grado de exposición al solvente, dado que la presencia de ligandos con grupos protectores promueve la facilidad de remoción local de agua.

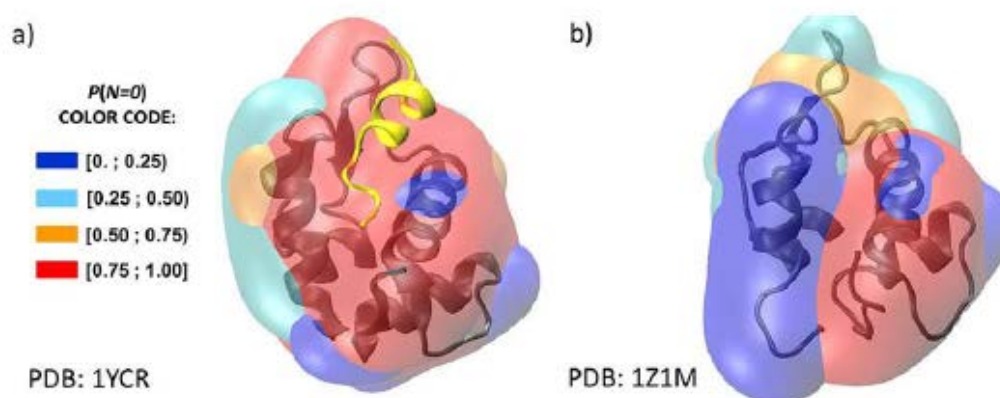


Figura 51: (a) Probabilidad de encontrar deshidratado $P(N = 0)$ el entorno de los puentes de hidrógeno del backbone del complejo proteico MDM2-p53. (b) ídem para la enzima libre.

En la figura se muestra la probabilidad de encontrar vacío de moléculas de agua ($P(N=0)$, ver capítulo 2 y 3) un volumen de muestreo ubicado en las proximidades de las interacciones del backbone de la proteína MDM2 (b) y MDM2 con su ligando P53 (a). Como podía suponerse, la incorporación del ligando promueve la deshidratación del sitio de unión. Esta interacción resulta de gran relevancia dado que la proteína p53 es un supresor tumoral (llamado el

“guardián del genoma”) el cual se encuentra mutado en más de la mitad de los casos de cáncer y el MDM2 es su regulador natural.

Más allá de las probadas diferencias entre las estructuras proteicas que se reportan en el PDB y lo que puede observarse en su comportamiento dinámico en solución, es importante notar que estas diferencias no se encuentran homogéneamente distribuidas en toda la estructura, sino especialmente concentradas en las regiones de mayor actividad biológica. Esto quiere decir que si bien existe una estructura preferida dentro de todo el ensamble de posibilidades, hay zonas de la proteína de mayor estabilidad que cimentan la estructura y zonas de mayor flexibilidad con mayor potencial para reconocer y unirse a ligandos.

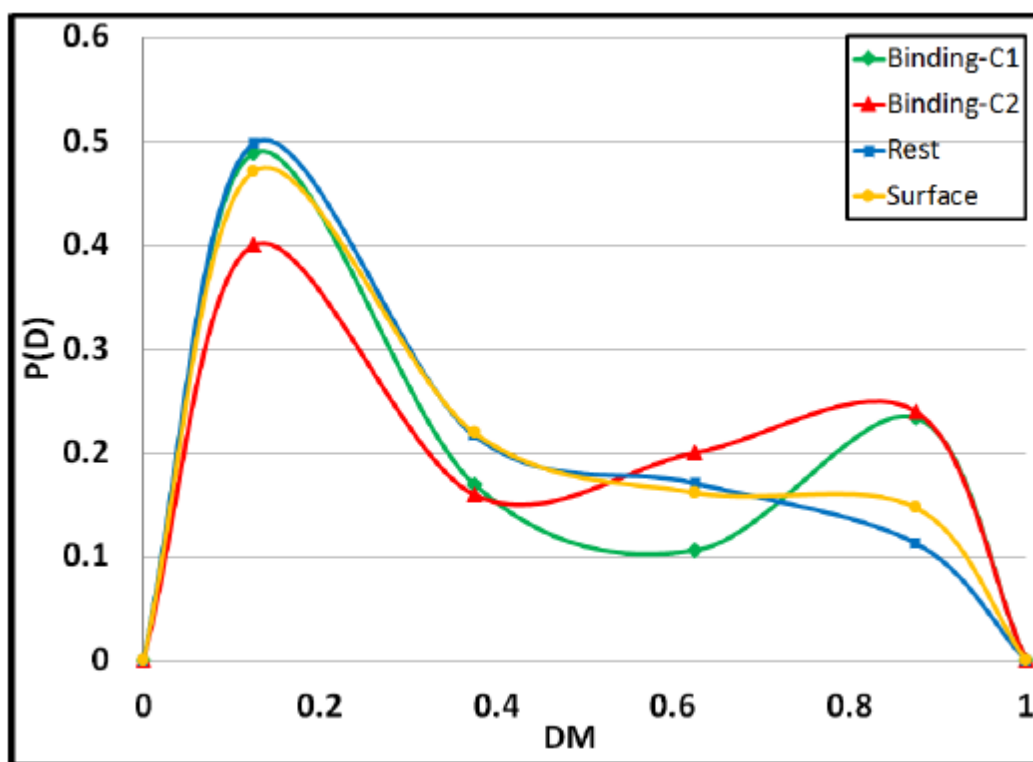


Figura 52: distribución de probabilidad para la matriz de distancia de proteínas en su forma apo, discriminada según la ubicación de las interacciones en: sitio de unión (verde y rojo), todos excepto los del sitio de unión (azul) o superficiales (amarillo).

En el gráfico anterior se muestra la distribución de probabilidad de ocurrencia de cada distancia en DM diferenciadas según la disposición espacial de esas interacciones en la proteína. Lo interesante de esta distribución es la marcada bimodalidad que se obtiene al considerar puentes de hidrógeno que pertenecen a la zona de binding (líneas roja o verde). Esto implica que hay una parte de esas interacciones con poca variación entre el PDB y la dinámica (lo cual no

sorprende demasiado puesto que el PDB corresponde a la estructura más probable de la proteína), pero también una fracción importante de ellos con una marcada movilidad dinámica (alto valor de D). Si se compara esta distribución con aquella que tiene en cuenta todo el resto de los puentes de hidrógeno de la proteína (línea azul), es decir, aquellos que no forman parte del sitio de unión, puede verse que el pico a grandes valores de D prácticamente desaparece, lo que indica una baja flexibilidad estructural. Dado que en el cálculo anterior pueden estar incluidos puentes de hidrógeno del backbone del núcleo de la proteína, que suelen estar muy protegidos del solvente, se incluye en el gráfico la fracción de esos puentes que se encuentran en la superficie de la proteína (línea amarilla). Finalmente, es evidente que si bien algunas de las interacciones superficiales presentan un cierto grado de discrepancia respecto al PDB, la población del pico de mayor distancia en la matriz es mucho menor que la vista para sitios de unión.

Relación entre puentes de hidrógeno camaleónicos y binding de proteínas

Según los estudios de nuestro grupo de investigación, reportados por Menéndez y colaboradores en³², existe una muy fuerte correlación entre la capacidad de un ligando para "estabilizar" estas interacciones (es decir, disminuir su valor en la matriz de distancia) y la eficiencia en el binding. Como ya vimos anteriormente, en complejos proteína-ligando o proteína-proteína, no se observan prácticamente interacciones camaleónicas, o, en otras palabras, la estructura cristalina de la proteína se mantiene a lo largo de la dinámica en solución.

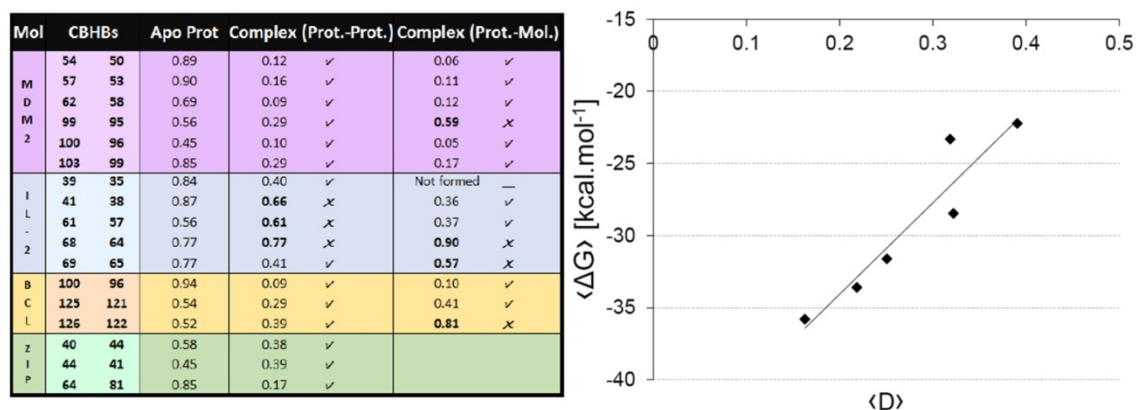


Figura 53: tabla izquierda: Valores de distancia D , para los puentes de hidrógeno camaleónicos de cuatro apo-proteínas, indicando el par de residuos involucrados en la interacción (primeras dos

columnas). Se indica también el valor de D para los complejos proteína-proteína (tercera columna) y proteína-ligando (cuarta columna). Valores de D por encima de 0.5, indican la presencia de un puente camaleónico (indicado en negrita). Con cruces y tildes se indica si el puente de hidrógeno continua siendo camaleónico o no. derecha: correlación entre energías de unión (ΔG) y valores de la matriz de distancia (D).

En la tabla de la derecha se muestran para una serie de proteínas estudiadas, la identificación del puente de hidrógeno de interés en el PDB y luego sus valores en la matriz de distancia en la proteína libre y la proteína formando complejos prot-prot o proteína ligando. En la tabla se muestran en "Negrita" aquellos valores de distancia que quedan por encima del criterio de corte para considerarlos "camaleónicos", es decir, aquellos con $D > 0.5$ (implica un comportamiento dinámico opuesto a lo reportado en la estructura cristalina). De esta tabla queda claro que prácticamente todos los puentes de hidrógeno camaleónicos son "desactivados" por efecto del ligando. Más aún, en la figura de la derecha se muestra que justamente esta diferencia en las matrices de distancia (promediadas sobre todos los puentes de hidrógeno camaleónicos) correlaciona muy bien con la energía libre de binding obtenida experimentalmente. En resumen, la capacidad de un ligando para estabilizar esas zonas "flexibles" de la proteína está íntimamente relacionada con su eficacia de unión.

Diferencias y similitudes entre los conceptos de PIM y la propensión dinámica de puentes de hidrógeno camaleónicos

Después de todo lo expuesto hasta aquí, de las definiciones y características establecidas alrededor de los conceptos de eventos PIM y puentes de hidrógeno camaleónicos, los puntos en común entre ambos resultan evidentes. En definitiva ambos enfoques muestran que la estructura cristalina de la proteína libre, que solo revela la conformación que corresponde al mínimo absoluto en el paisaje de energía potencial de la macromolécula, no se corresponde con la estructura químicamente más relevante para el binding. En ambos casos el estudio se centra en la identificación de puentes de hidrógeno del backbone que son los últimos responsables del ordenamiento espacial local de los sitios de unión, y, a su vez, ambas teorías relacionan las diferencias en su comportamiento con la influencia del solvente a su alrededor. Dicho esto, es válido suponer que los puentes de hidrógeno capturados por una teoría como

camaleónicos, sean los mismos que la otra identifica involucrados en eventos de metaestabilidad inducida.

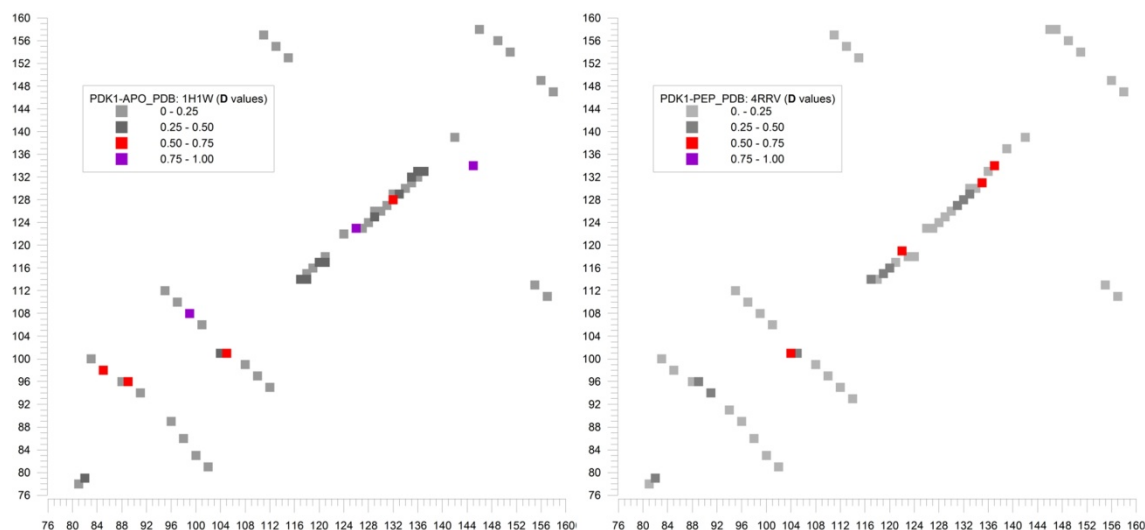


Figura 54: matrices de distancia para la proteína PDK1 libre (izquierda) y unida a un efector alostérico (derecha).

En la figura anterior se muestra las matrices de distancia para la proteína quinasa PDK1, donde efectivamente puede verse que los sitios de mayor discrepancia dinámica se encuentran en las zonas de unión (en este caso en ambas zonas: unión a ATP y unión al efector alostérico). Además se comprueba que estas zonas son estabilizadas una vez incorporado el ligando (derecha). Esto demuestra, al menos, que las conclusiones a las que se arriba tanto con la teoría de PIMS como con la de propensión dinámica de puentes de hidrógeno concuerdan puntualmente.

Solo cabe comprobar entonces, si en efecto la teoría más general de interacciones camaleónicas puede englobar a lo observado con el enfoque de PIMs.

ITK (APO) PDB: 1SNX	APO ENZYME	INHIBITED ENZYME	*each simulation = 20 ns 4k configs APO ENZYME									
			FTF		D							
			ρ	ρ without ligand	HBs PDB	*1st	*2nd	*1st	*2nd			
ITK in complex with sunitinib PIMS												
GLY VAL 370 377	*	13	0.000	0.464	0.456	-0.464	-0.456					
GLY MET 441 438	*	17	0.000	0.381	0.501	-0.381	-0.501					
SER ASN 499 487	*	17	0.000	0.333	0.057	-0.333	-0.057					

Tabla 11: relación entre la ocurrencia de eventos PIM y la presencia de puentes de hidrógeno camaleónicos. Se indica el par de residuos de interacción (1ª columna), el nivel de arropamiento de la interacción (ρ) de la enzima apo (2ª columna) y de la enzima inhibida (3ª columna). La cuarta columna indica si el puente esta o no formado en la estructura cristalina de la enzima libre, la quinta columna indica el tiempo que la interacción es formada en la dinámica (por duplicado) y la sexta columna indica el valor de D de la interacción (por duplicado). Resultados obtenidos sobre la proteína quinasa ITK y su inhibidor.

KIT (APO) - DFGin PDB: 1PKG			APO ENZYME	INHIBITED ENZYME	*each simulation = 20 ns 4k configs APO ENZYME				
KIT kinase in complex with imatinib PIMS			ρ	ρ without ligand	HBs PDB	FTF		D	
						*1st	*2nd	*1st	*2nd
LEU VAL	595	603	20	19	1.000	0.890	0.935	0.110	0.065
GLU ALA	640	636	19	17	1.000	0.730	0.525	0.270	0.475
LEU GLU	644	640	23	19	1.000	0.988	0.929	0.012	0.071
GLY LEU	648	644	21	16	1.000	0.586	0.666	0.414	0.334
GLY CYS	676	673	*	16	0.000	0.807	0.840	-0.807	-0.840
CYS ASN	809	797	23	19	1.000	0.855	0.850	0.145	0.150

Tabla 12: relación entre la ocurrencia de eventos PIM y la presencia de puentes de hidrógeno camaleónicos. Se indica el par de residuos de interacción (1ª columna), el nivel de arropamiento de la interacción (ρ) de la enzima apo (2ª columna) y de la enzima inhibida (3ª columna). La cuarta columna indica si el puente esta o no formado en la estructura cristalina de la enzima libre, la quinta columna indica el tiempo que la interacción es formada en la dinámica (por duplicado) y la sexta columna indica el valor de D de la interacción (por duplicado). Resultados obtenidos sobre la proteína quinasa KIT y su inhibidor.

En las tablas anteriores, escogidas especialmente para ilustrar lo que ocurre al estudiar la propensión dinámica de puentes de hidrógeno involucrados en eventos de metaestabilidad, puede advertirse un importante diferencia entre lo que ocurre para los dos tipos de eventos PIM (puente formado o no en la enzima libre). El primero de los casos; que se describe como la inducción de una interacción inexistente en la proteína libre, subóptima pero luego estabilizada por efecto arropador del ligando; presenta un buen grado de concordancia con lo propuesto en el enfoque de Menéndez, es decir, un alto valor absoluto de D en aquellos sitios de la proteína de mayor reactividad. Sin embargo, al estudiar los casos en los que la interacción es estable en la proteína libre (mayoritarios en el ejemplo de la proteína KIT), si bien clasificados como eventos PIM (la interacción pasa por un estado intermedio inestable que luego es re-estabilizado por el ligando), se obtienen valores muy bajos en la matriz de distancia, y, por lo tanto, no constituyen puentes camaleónicos.

La comparación establecida en el punto anterior nos deja algunos interrogantes respecto a la generalidad de la aplicación de uno u otro método. Por un lado es razonable que aquellos puentes de hidrógeno bien protegidos en la enzima libre no sean fácilmente desintegrados aún en solución, esto quiere decir, que tal vez puedan ser importantes para el binding pero que el tiempo requerido para su disolución sea superior a los tiempos accesibles por dinámica molecular. La otra explicación posible de estas diferencias, dado que la

eficiencia en la predicción de motivos de unión mediante la identificación de puentes camaleónicos por dinámica molecular ha sido extensamente probada en otros sistemas, es que este tipo de evento PIM no sea finalmente relevante para el binding.

En conclusión, podemos decir que ambos enfoques comparten similitudes pero también presentan diferencias relevantes. El estudio de propensiones dinámicas sin embargo, parece un enfoque más intuitivo y natural, puesto que no requiere de definiciones arbitrarias (como hicimos con el concepto de Dehidrón) y no requiere del conocimiento de la estructura del complejo proteína-ligando. Es posible no obstante, que algunos de los motivos estructurales observados en eventos PIMs, de ser relevantes para el binding, se subestimen por su baja probabilidad de ocurrencia en los tiempos simulados computacionalmente.

Conclusiones del capítulo

En este capítulo hemos probado acabadamente la importancia del efecto del solvente sobre las interacciones electrostáticas en medios biológicos. Hemos visto que tanto la teoría que predice motivos y mecanismos de regulación alostérica por medio de eventos PIM, como la que incluye puentes de hidrógeno camaleónicos se sustentan en la diferencia de estabilidad de esas interacciones en función de su grado de protección respecto del ataque del agua.

Hemos concluido que, dada la naturaleza inherentemente dinámica de las proteínas y de su interacción con el solvente, es necesario ver más allá de la información que ofrece la cristalografía de rayos X para entender los mecanismos fisicoquímicos que ocurren en medios biológicos. Como hemos ya señalado, la química de la vida ofrece miles de variaciones haciendo uso de unos pocos elementos químicos tradicionales, por lo tanto, es tal vez su naturaleza dinámica la que esconde ese potencial.

Establecimos un modo novedoso de interpretación de los mecanismos de regulación alostérica, que comprende los requerimientos estructurales establecidos por las ideas originales de Lumry y Eyring. Este enfoque pone de manifiesto como la naturaleza hace uso de un manejo muy delicado del

equilibrio químico para maximizar sus posibilidades de interacción. De hecho probamos que son aquellas configuraciones menos estables del sistema en equilibrio termodinámico las que dirigen el pasaje hacia distintos estados.

Cabe expresar antes de pasar a las conclusiones generales de la tesis, que aún quedan una infinidad de aspectos de la química de proteínas sin resolver, algunos de las cuales incluso podrían ser abordadas en el marco de los conceptos que fuimos desarrollando en los capítulos precedentes, que si bien quedan fuera del alcance de este trabajo, sin dudas constituyen parte de los objetivos a futuro derivados del doctorado.

Capítulo 6

Conclusiones generales

El objetivo de este trabajo de tesis fue planteado desde el comienzo como una búsqueda de conciliación entre aquellos aspectos de la fisicoquímica moderna dedicados al estudio del agua en distintos contextos, que incluso han llegado a la categorización de distintos sistemas en función del efecto que producen sobre el solvente y aquellos que, por el contrario, se focalizan en los motivos químicos y estructurales de esos sistemas, entendiendo el agua simplemente como el medio en el que se desarrollan los acontecimientos de su interés.

Si la vanidad no me engaña, y aunque corresponde al lector la evaluación última de los aciertos y desaciertos de este trabajo, creo que el mayor mérito de esta presentación es el recorrido conceptual que hemos logrado hilvanar. Como se ha mencionado al comienzo de la tesis, la mayor parte de la información que aquí se presenta ya formaba parte del repositorio de conocimiento universal; sin embargo, creo que se han logrado establecer algunas conexiones conceptuales quizás por primera vez, fundamentadas, por supuesto, a través de experimentos de simulación diseñados específicamente con ese objetivo.

Algunas de las contribuciones originales de este trabajo pueden ser resumidas en los siguientes puntos:

- En el capítulo uno completamos, mediante experimentos de dinámica molecular, los aspectos estructurales y dinámicos que sustentan la "teoría de los dos estados" propuesta por Tanaka para agua pura^{48,64}. Particularmente, demostramos que, al menos en el modelo de agua SPCE (cuyo comportamiento verificamos que se ajusta mejor a lo observado experimentalmente que TIP5P), eliminando el "ruido térmico" mediante la derivación a sus estructuras inherentes, se obtiene una bimodalidad en su grado de estructuración local; con una población "desestructurada" caracterizada por una variedad de estados de alta entropía (y por lo tanto sensibles a la temperatura) y otra de alta

estructura, sustentada en la formación de puentes de hidrógeno de alta calidad y, por lo tanto, relativamente insensible a la temperatura.

En el primer capítulo también ahondamos en la descripción pormenorizada de las características estructurales de cada estado de ordenamiento, particularmente remarcando las diferencias de comportamiento de los cuartos y quintos vecinos en cada caso.

Finalmente establecimos una correspondencia entre la dinámica de los procesos de relajación vítrea del agua pura y la dinámica de interconversión entre estados de alto y bajo ordenamiento local.

- En el segundo capítulo exploramos las implicancias de considerar sistemas acuosos en entornos de nano confinamiento. Particularmente, demostramos que simplemente considerar la polaridad de los átomos de un sistema no alcanza para garantizar comportamiento hidrofóbico o hidrofílico. Probamos que, por ejemplo, el grafeno, históricamente catalogado como hidrofóbico, constituido íntegramente por átomos de carbono (de baja polaridad), presenta un comportamiento marcadamente hidrofílico. Pudimos atribuir, además, la causa de dicha hidrofiliidad a la densidad de contribuciones del tipo Van der Waals en su superficie.

Finalmente, en la segunda mitad del capítulo estudiamos cómo incluso, más allá de las propiedades químicas de un sistema, su comportamiento en agua puede estar enteramente dictaminado por la curvatura superficial. Específicamente, pudimos demostrar, mediante estudios de fluctuaciones de densidad local, que los sistemas se vuelven progresivamente más hidrofóbicos a medida que disminuye su radio de curvatura superficial. Más aún, definimos el alcance espacial de este efecto, siendo particularmente importante en huecos de menos de veintidós angstroms, pero aún perceptible (respecto a una superficie plana) en cavidades de hasta cuarenta angstroms de diámetro.

- En el capítulo cuatro examinamos cómo las características del agua confinada aprendidas en el capítulo anterior afectan a las interacciones electrostáticas que en ella tienen lugar. Por medio de un estudio sistemático de las energías de autoensamblado de sistemas con cargas embebidas en distintos entornos químicos, pudimos probar que la

hidrofobicidad local optimiza las interacciones de carga. De hecho mostramos que por medio de la selección del entorno químico apropiado se puede duplicar la energía de autoensamblado de los sistemas estudiados, aún con exactamente la misma interacción de cargas. Por último, pero no por ello menos importante, pudimos atribuir casi la totalidad de la diferencia encontrada sobre las energías de enlace a un comportamiento diferencial del agua hidratando cada uno de los sistemas.

- En el quinto y último capítulo de esta tesis investigamos la ocurrencia de algunos de los fenómenos antes descritos en sistemas complejos, específicamente en proteínas. Con el conocimiento adquirido en capítulos anteriores, pudimos corroborar la influencia del grado de exposición al solvente sobre algunas interacciones electrostáticas de relevancia. En especial, pudimos ver que el nivel de desprotección en puentes de hidrógeno del backbone de la proteína no solo afecta la intensidad de dicha interacción sino que, finalmente, termina condicionando la estructura local e incluso la dinámica en solución de la proteína.

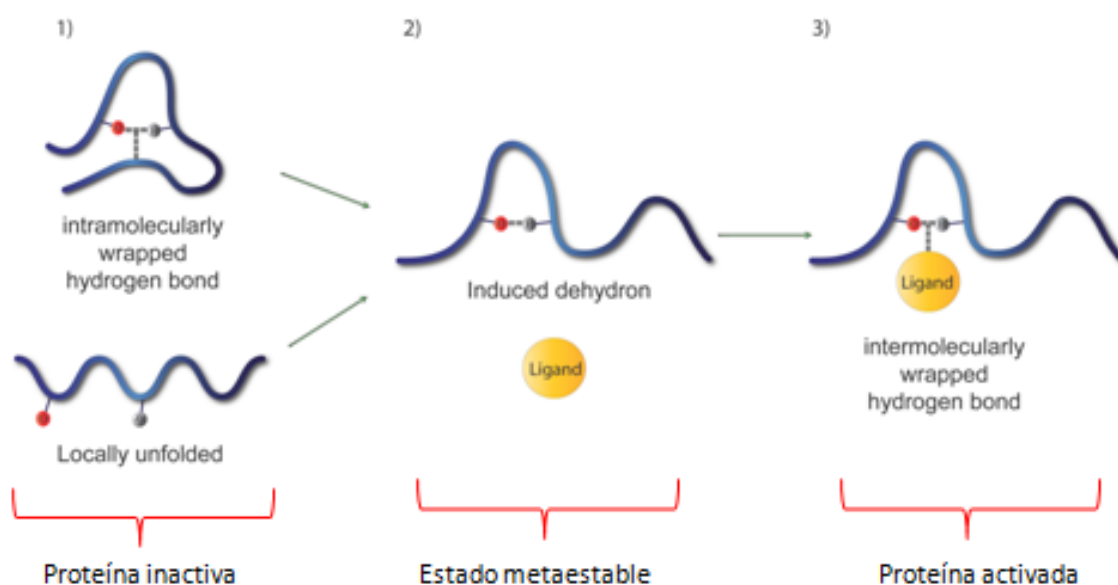


Figura 55: reproducción de la figura 43 mostrada en el capítulo 5.

En este capítulo propusimos además un modelo para el mecanismo de regulación alostérica en proteínas quinasas, caracterizado por la necesidad de las enzimas de degradar su estructura original, pasando

por una configuración metaestable, susceptible de ser reestabilizada por el efector alostérico. Llamamos a este mecanismo de regulación "evento de metaestabilidad productiva inducida por el ligando" (o productive induced metastability -PIM event-) resumido en la figura 55.

- En este capítulo argumentamos también la necesidad de incorporar la noción de proteínas como objetos inherentemente dinámicos, es decir, de entender que existen motivos de unión y reconocimiento molecular no necesariamente identificables en la estructura termodinámicamente más estable (normalmente obtenida por cristalografía de rayos X) sino, más bien, circunscritos a estados transitorios en la dinámica. Particularmente, demostramos que existen zonas de la proteína, aquellas de mayor reactividad, que presentan una diferencia dinámica especialmente exacerbada respecto de lo observable en la estructura cristalina. Asimismo probamos que estas zonas de mayor variabilidad dinámica, especialmente involucradas en el reconocimiento y unión de sustratos, tienden a volverse más rígidas una vez acoplado el ligando.
- Finalmente, y en concordancia con las conclusiones de los capítulos precedentes, pudimos comprobar que, tanto los eventos de metaestabilidad inducida (PIMs) como las propensiones dinámicas de la estructura local de las proteínas, están fuertemente determinadas por las características del agua en el entorno de las interacciones no covalentes.

Es oportuno mencionar que, más allá de esta lista de conclusiones que trata de enumerar de forma concisa y autocontenida los resultados obtenidos a lo largo de todo este trabajo de tesis, el lector puede profundizar en las conclusiones particulares de cada capítulo y, especialmente, en las conclusiones de aquellos artículos publicados en revistas científicas que les dan origen.

Para terminar solo queda decir que, más allá de los alcances de esta tesis que pueden advertirse en los aspectos plasmados hasta aquí, una de las virtudes del trabajo, tanto en lo conceptual como en lo metodológico, es su potencialidad de aplicación en temáticas que aún no han sido abordadas. A mi entender, el producto más valioso de esta tesis es la construcción progresiva de un enfoque integrado sobre una problemática que atraviesa casi todos los campos de la química. Las interacciones no covalentes son parte de las

fuerzas fundamentales que gobiernan innumerables fenómenos fisicoquímicos y el agua, el solvente por naturaleza. Este trabajo fue un humilde intento por aunar ambas cuestiones dentro de una misma visión integral.

Bibliografía

1. Hegel, G. L. F. *Enciclopedia de las Ciencias Filosóficas* [1830]. (Abada, 2017).
2. Wood, A. W. *Hegel's ethical thought*. (Cambridge University Press, 1990).
3. Chaplin, M. Water structure and science. (2000). Available at: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/index.html>.
4. Fayer, M. D. & Levinger, N. E. Analysis of Water in Confined Geometries and at Interfaces. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **3**, 89–107 (2010).
5. Giovambattista, N., Rossky, P. J. & Debenedetti, P. G. Computational studies of pressure, temperature, and surface effects on the structure and thermodynamics of confined water. *Annu. Rev. Phys. Chem.* (2012).
6. Cicero, G., Grossman, J. C., Schwegler, E., And, F. G. & Galli, G. Water Confined in Nanotubes and between Graphene Sheets: A First Principle Study. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1871–1878 (2008).
7. Giovambattista, N., Lopez, C. F., Rossky, P. J. & Debenedetti, P. G. Hydrophobicity of protein surfaces: Separating geometry from chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2274–9 (2008).
8. Brovchenko, I. & Oleinikova, A. *Interfacial and confined water*. (Elsevier, 2008).
9. Han, S., Choi, M. Y., Kumar, P. & Stanley, H. E. Phase transitions in confined water nanofilms. *Nat. Phys.* **6**, 685–689 (2010).
10. Rasaiah, J. C., Garde, S. & Hummer, G. Water in Nonpolar Confinement: From Nanotubes to Proteins and Beyond. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **59**, 713–740 (2008).
11. Sharma, S. & Debenedetti, P. G. Evaporation rate of water in hydrophobic confinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4365–70 (2012).
12. Alarcón, L. M. *et al.* Hydration and nanoconfined water: Insights from computer simulations. *Subcell. Biochem.* (2015).
13. Giovambattista, N., Debenedetti, P. G. & Rossky, P. J. Enhanced surface hydrophobicity by coupling of surface polarity and topography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15181–5 (2009).
14. Jamadagni, S. N., Godawat, R. & Garde, S. Hydrophobicity of Proteins

- and Interfaces: Insights from Density Fluctuations. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2**, 147–171 (2011).
15. Barber, A. H., Cohen, S. R. & Wagner, H. D. Static and Dynamic Wetting Measurements of Single Carbon Nanotubes. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 186103 (2004).
 16. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. & Weikl, T. R. The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 289–316 (2008).
 17. Berne, B. J., Weeks, J. D. & Zhou, R. Dewetting and Hydrophobic Interaction in Physical and Biological Systems. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 85–103 (2009).
 18. Dill, K. A. & MacCallum, J. L. The Protein-Folding Problem, 50 Years On. *Science (80-.)*. **338**, 1042–1046 (2012).
 19. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **437**, 640–647 (2005).
 20. Giovambattista, N., Debenedetti, P. G. & Rossky, P. J. Effect of surface polarity on water contact angle and interfacial hydration structure. *J. Phys. Chem. B* (2007).
 21. Bogan, A. A. & Thorn, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **280**, 1–9 (1998).
 22. Kulp, J. L., Kulp, J. L., Pompliano, D. L. & Guarnieri, F. Diverse Fragment Clustering and Water Exclusion Identify Protein Hot Spots. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10740–10743 (2011).
 23. Li, J. & Liu, Q. ‘Double water exclusion’: a hypothesis refining the O-ring theory for the hot spots at protein interfaces. *Bioinformatics* **25**, 743–750 (2009).
 24. Onsager, L. Electric Moments of Molecules in Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 1486–1493 (1936).
 25. Kirkwood, J. G. The Dielectric Polarization of Polar Liquids. *J. Chem. Phys.* **7**, 911–919 (1939).
 26. Fröhlich, H. *Theory of dielectrics dielectric constant and dielectric loss*. (Clarendon Press, 1949).
 27. Hasted, J. B., Ritson, D. M. & Collie, C. H. Dielectric Properties of Aqueous Ionic Solutions. Parts I and II. *J. Chem. Phys.* **16**, 1–21 (1948).
 28. Noriyuki Yoshii, Shinichi Miura, S. O. A molecular dynamics study of

- dielectric constant of water from ambient to sub- and supercritical conditions using a fluctuating-charge potential model. *Chem. Phys. Lett.* **345**, 195–200 (2001).
29. J.F.Nagle. Theory of the dielectric constant of ice. *Chem. Phys.* **43**, 317–328 (1979).
 30. Frank, H. S. Free Volume and Entropy in Condensed Systems I. General Principles. Fluctuation Entropy and Free Volume in Some Monatomic Crystals. *J. Chem. Phys.* **13**, 478–492 (1945).
 31. Montes de Oca, J., Rodriguez Fris, A., Appignanesi, G. & Fernández, A. Productive induced metastability in allosteric modulation of kinase function. *FEBS J.* **281**, 3079–3091 (2014).
 32. Menéndez, C. A., Accordino, S. R., Gerbino, D. C. & Appignanesi, G. A. THE EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL E ‘ Chameleonic ’ backbone hydrogen bonds in protein binding and as drug targets. *Eur. Phys. J. E* (2015).
 33. Sierra, M. B. *et al.* Protein packing defects ‘heat up’ interfacial water. *Eur. Phys. J. E* **36**, 62 (2013).
 34. Fernández, A. *Transformative concepts for drug design: Target wrapping. Transformative Concepts for Drug Design: Target Wrapping* (2010).
 35. Patel, A. J. *et al.* Sitting at the Edge: How Biomolecules use Hydrophobicity to Tune Their Interactions and Function. *J. Phys. Chem. B* **116**, 2498–2503 (2012).
 36. Patel, A. J., Varilly, P. & Chandler, D. Fluctuations of Water near Extended Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. *J. Phys. Chem. B* **114**, 1632–1637 (2010).
 37. Hua, L., Zangi, R. & Berne, B. J. Hydrophobic interactions and dewetting between plates with hydrophobic and hydrophilic domains. *J. Phys. Chem. C* (2009).
 38. Fernández, A. Local solvent dielectrics and destabilization of solvent-exposed states in folding proteins. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* (2002).
 39. Montes de Oca, J. M., Menéndez, C. A., Accordino, S. R., Malaspina, D. C. & Appignanesi, G. A. Studies on electrostatic interactions within model nano-confined aqueous environments of different chemical nature. *Eur. Phys. J. E* **40**, 78 (2017).

40. Debenedetti, P. G. *Metastable Liquids Concepts and Principles*. (Princeton University Press, 1996).
41. Stanley, H. E. *et al.* The puzzling unsolved mysteries of liquid water: Some recent progress. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **386**, 729–743 (2007).
42. Choudhury, N. and & Pettitt, B. M. Dynamics of Water Trapped between Hydrophobic Solutes. *J. Phys. Chem. B* **109**, 6422–6429 (2005).
43. Karplus, M., Vitkup, D., Ringe, D. & Petsko, G. A. Solvent mobility and the protein ‘glass’ transition. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 34–38 (2000).
44. Anna Rita Bizzarri and & Cannistraro, S. Molecular Dynamics of Water at the Protein–Solvent Interface. *J. Phys. Chem. B* **106**, 6617–6633 (2002).
45. Huang, X., Margulis, C. J. & Berne, B. J. Dewetting-induced collapse of hydrophobic particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003).
46. Huang, D. & Chandler, D. Temperature and length scale dependence of hydrophobic effects and their possible implications for protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000).
47. Appignanesi, G. A., Rodriguez Fris, J. A. & Sciortino, F. Evidence of a two-state picture for supercooled water and its connections with glassy dynamics. *Eur. Phys. J. E* **29**, 305–310 (2009).
48. Tanaka, H. Simple Physical Explanation of the Unusual Thermodynamic Behavior of Liquid Water. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 5750–5753 (1998).
49. Shiratani, E. & Sasai, M. Molecular scale precursor of the liquid–liquid phase transition of water. *J. Chem. Phys.* **108**, 3264 (1998).
50. Shiratani, E. & Sasai, M. Growth and collapse of structural patterns in the hydrogen bond network in liquid water. *J. Chem. Phys.* **104**, 7671 (1998).
51. Angell, C. A. AMORPHOUS WATER. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **55**, 559–583 (2004).
52. Angell, C. A. Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions. *Chem. Rev.* **102**, 2627–2650 (2002).
53. Stanley, H. E. & Mishima, O. The relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature* **396**, 329–335 (1998).
54. Loerting, T. & Giovambattista, N. Amorphous ices: experiments and numerical simulations. *J. Phys. Condens. Matter* **18**, R919–R977 (2006).
55. Urquidi, J. *et al.* A structural comparison of supercooled water and

- intermediate density amorphous ices. *Mol. Phys.* **102**, 2007–2014 (2004).
56. Heide, H.-G. Observations on ice layers. *Ultramicroscopy* **14**, 271–278 (1984).
 57. Mishima, O., Calvert, L. D. & Whalley, E. ‘Melting ice’ I at 77 K and 10 kbar: a new method of making amorphous solids. *Nature* **310**, 393–395 (1984).
 58. CHAU, P.-L. & HARDWICK, A. J. A new order parameter for tetrahedral configurations. *Mol. Phys.* **93**, 511–518 (1998).
 59. Errington, J. R. & Debenedetti, P. G. Relationship between structural order and the anomalies of liquid water. *Nature* **409**, 318–321 (2001).
 60. Naberukhin, Y. I., Voloshin, V. P. & Medvedev, N. N. Geometrical analysis of the structure of simple liquids: percolation approach. *Mol. Phys.* **73**, 917–936 (1991).
 61. Oleinikova, A. & Brovchenko, I. Percolating networks and liquid–liquid transitions in supercooled water. *J. Phys. Condens. Matter* **18**, S2247–S2259 (2006).
 62. Stillinger, F. H. & Weber, T. A. Inherent structure in water. *J. Phys. Chem.* **87**, 2833–2840 (1983).
 63. Accordino, S. R., Rodriguez Fris, J. A., Sciortino, F. & Appignanesi, G. A. Quantitative investigation of the two-state picture for water in the normal liquid and the supercooled regime. *Eur. Phys. J. E* **34**, 48 (2011).
 64. Tanaka, H. Simple physical model of liquid water. *J. Chem. Phys.* **112**, 799 (1999).
 65. Gelman Constantin, J. *et al.* Structure of supercooled water in clusters and bulk and its relation to the two-state picture of water: Results from the TIP4P-ice model. *Eur. Phys. J. E* **34**, 126 (2011).
 66. Santra, B., DiStasio, R. A., Martelli, F. & Car, R. Local structure analysis in *ab initio* liquid water. *Mol. Phys.* **113**, 2829–2841 (2015).
 67. Appignanesi, G. A., Rodríguez Fris, J. A., Montani, R. A. & Kob, W. Democratic Particle Motion for Metabasin Transitions in Simple Glass Formers. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 57801 (2006).
 68. Appignanesi, G. A., Rodríguez Fris, J. A. & Frechero, M. A. Reproducibility of Dynamical Heterogeneities and Metabasin Dynamics in Glass Forming Liquids: The Influence of Structure on Dynamics. *Phys.*

- Rev. Lett.* **96**, 237803 (2006).
69. Appignanesi, G. A. & Rodriguez Fris, J. A. Space and time dynamical heterogeneity in glassy relaxation. The role of democratic clusters. *J. Phys. Condens. Matter* **21**, 203103 (2009).
 70. Debenedetti, P. G. & Stillinger, F. H. Supercooled liquids and the glass transition. *Nature* **410**, 259–267 (2001).
 71. Ohmine, I. Liquid Water Dynamics: Collective Motions, Fluctuation, and Relaxation. *J. Phys. Chem.* **99**, 6767–6776 (1995).
 72. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D. & van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **91**, 43–56 (1995).
 73. Lindahl, E., Hess, B. & van der Spoel, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* **7**, 306–317 (2001).
 74. Salomon-Ferrer, R., Case, D. A. & Walker, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci* (2012).
 75. Zielkiewicz, J. Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water. *J. Chem. Phys.* **123**, 104501 (2005).
 76. Wikfeldt, K. T. *et al.* Spatially inhomogeneous bimodal inherent structure of simulated liquid water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 19918 (2011).
 77. Russo, J. & Tanaka, H. Understanding water's anomalies with locally favored structures. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
 78. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–88 (2005).
 79. Wang, C. *et al.* Stable Liquid Water Droplet on a Water Monolayer Formed at Room Temperature on Ionic Model Substrates. *Phys. Rev. Lett.* **103**, 137801 (2009).
 80. Accordino, S. R., Montes De Oca, J. M., Rodriguez Fris, J. A. & Appignanesi, G. A. Hydrophilic behavior of graphene and graphene-based materials. *J. Chem. Phys.* (2015).
 81. Alarcon, L. M., Montes de Oca, J. M., Accordino, S. R., Rodriguez Fris, J. A. & Appignanesi, G. A. Hydrophobicity and geometry: Water at curved graphitic-like surfaces and within model pores in self-assembled

- monolayers. *Fluid Phase Equilib.* **362**, 81–86 (2014).
82. Schulz, E., Frechero, M., Appignanesi, G., Fernández, A. & Haak, J. Sub-Nanoscale Surface Ruggedness Provides a Water-Tight Seal for Exposed Regions in Soluble Protein Structure. *PLoS One* **5**, e12844 (2010).
 83. Vaitheeswaran, S., Yin, H., Rasaiah, J. C. & Hummer, G. Water clusters in nonpolar cavities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17002–5 (2004).
 84. Schulz, E. P., Alarcón, L. M. & Appignanesi, G. A. Behavior of water in contact with model hydrophobic cavities and tunnels and carbon nanotubes. *Eur. Phys. J. E* **34**, 114 (2011).
 85. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
 86. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).
 87. Shen, Y. R. and Ostroverkhov, V. Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy on Water Interfaces: Polar Orientation of Water Molecules at Interfaces. *Chem. Rev.* **106**, 1140–1154 (2006).
 88. Alarcón, L. M., Malaspina, D. C., Schulz, E. P., Frechero, M. A. & Appignanesi, G. A. Structure and orientation of water molecules at model hydrophobic surfaces with curvature: From graphene sheets to carbon nanotubes and fullerenes. *Chem. Phys.* **388**, 47–56 (2011).
 89. Malaspina, D. C., Schulz, E. P., Alarcón, L. M., Frechero, M. A. & Appignanesi, G. A. Structural and dynamical aspects of water in contact with a hydrophobic surface. *Eur. Phys. J. E* **32**, 35–42 (2010).
 90. Fan, Y., Chen, X., Yang, L., Cremer, P. S. & Gao, Y. Q. On the Structure of Water at the Aqueous/Air Interface. *J. Phys. Chem. B* **113**, 11672–11679 (2009).
 91. Accordino, S. R., Malaspina, D. C., Rodríguez Fris, J. A. & Appignanesi, G. A. Comment on ‘Glass Transition in Biomolecules and the Liquid-Liquid Critical Point of Water’. *Phys. Rev. Lett.* **106**, 29801 (2011).
 92. Giovambattista, N., Pablo G. Debenedetti, A. & Rossky, P. J. Effect of Surface Polarity on Water Contact Angle and Interfacial Hydration Structure. *J. Phys. Chem. B* **111**, 9581–9587 (2007).

93. Shih, C.-J. *et al.* Breakdown in the Wetting Transparency of Graphene. *Phys. Rev. Lett.* **109**, 176101 (2012).
94. Rafiee, J. *et al.* Wetting transparency of graphene. *Nat. Mater.* (2012).
95. Taherian, F., Marcon, V., van der Vegt, N. F. A. & Leroy, F. What Is the Contact Angle of Water on Graphene? *Langmuir* **29**, 1457–1465 (2013).
96. Werder, T., Walther, J. H., Jaffe, R. L., And, T. H. & Koumoutsakos, P. On the Water–Carbon Interaction for Use in Molecular Dynamics Simulations of Graphite and Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. B* **107**, 1345–1352 (2003).
97. Garcia, R., Osborne, K. & Subashi, E. Validity of the ‘Sharp-Kink Approximation’ for Water and Other Fluids. *J. Phys. Chem. B* **112**, 8114–8119 (2008).
98. Fowkes, F. M. & Harkins, W. D. The State of Monolayers Adsorbed at the Interface Solid—Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 3377–3386 (1940).
99. Morcos, I. On contact angle and dispersion energy of the cleavage graphite/water system. *J. Colloid Interface Sci.* **34**, 469–471 (1970).
100. Shin, Y. J. *et al.* Surface-Energy Engineering of Graphene. *Langmuir* **26**, 3798–3802 (2010).
101. Kim, K.-S. *et al.* Chemical Vapor Deposition-Grown Graphene: The Thinnest Solid Lubricant. *ACS Nano* **5**, 5107–5114 (2011).
102. Accordino, S. R., Malaspina, D. C., Rodriguez Fris, J. A., Alarcón, L. M. & Appignanesi, G. A. Temperature dependence of the structure of protein hydration water and the liquid-liquid transition. *Phys. Rev. E* **85**, 31503 (2012).
103. Waghe, A., Rasaiah, J. C. & Hummer, G. Entropy of single-file water in (6,6) carbon nanotubes. *J. Chem. Phys.* **137**, 44709 (2012).
104. Waghe, A., Rasaiah, J. C. & Hummer, G. Filling and emptying kinetics of carbon nanotubes in water. *J. Chem. Phys.* **117**, 10789–10795 (2002).
105. Hummer, G., Rasaiah, J. C. & Noworyta, J. P. Water conduction through the hydrophobic channel of a carbon nanotube. *Nature* **414**, 188–190 (2001).
106. Li, L., Bedrov, D. & Smith, G. D. A molecular-dynamics simulation study of solvent-induced repulsion between C60 fullerenes in water. *J. Chem.*

- Phys.* **123**, 204504 (2005).
107. Athawale, M. V., Jamadagni, S. N. & Garde, S. How hydrophobic hydration responds to solute size and attractions: Theory and simulations. *J. Chem. Phys.* **131**, 115102 (2009).
 108. Garde, S. & Patel, A. J. Unraveling the hydrophobic effect, one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16491–2 (2011).
 109. Li, Z. *et al.* Effect of airborne contaminants on the wettability of supported graphene and graphite. *Nat. Mater.* (2013).
 110. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. *Chem. Phys. Lett.* **28**, 578–581 (1974).
 111. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *J. Comput. Phys.* (1977).
 112. Patey, G. N. & Valleau, J. P. The free energy of spheres with dipoles: Monte Carlo with multistage sampling. *Chem. Phys. Lett.* (1973).
 113. Acharya, H., Vembanur, S., Jamadagni, S. N. & Garde, S. Mapping hydrophobicity at the nanoscale: applications to heterogeneous surfaces and proteins. *Faraday Discuss.* **146**, 353-65-93, 395–401 (2010).
 114. Dobson, C. M., Šali, A. & Karplus, M. Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 868–893 (1998).
 115. Li, H., Tang, C. & Wingreen, N. S. Nature of Driving Force for Protein Folding: A Result From Analyzing the Statistical Potential. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 765–768 (1997).
 116. National Academy of Sciences (U.S.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (The Academy, 1915).
 117. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 574–581 (2009).
 118. Levy, Y. & Onuchic, J. N. WATER MEDIATION IN PROTEIN FOLDING AND MOLECULAR RECOGNITION. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 389–415 (2006).
 119. Najji, A., Kanduč, M., Netz, R. R. & Podgornik, R. Exotic Electrostatics: Unusual Features of Electrostatic Interactions between Macroions.

- arXiv:1008.0357 [cond-mat.soft]* (2010).
120. Schneck, E., Sedlmeier, F. & Netz, R. R. Hydration repulsion between biomembranes results from an interplay of dehydration and depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 14405–9 (2012).
 121. Rinne, K. F., Schulz, J. C. F. & Netz, R. R. Impact of secondary structure and hydration water on the dielectric spectrum of poly-alanine and possible relation to the debate on slaved versus slaving water. *J. Chem. Phys.* **142**, 215104 (2015).
 122. Kanduč, M. & Netz, R. R. From hydration repulsion to dry adhesion between asymmetric hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 12338–43 (2015).
 123. Kanduč, M. & Netz, R. R. Hydration force fluctuations in hydrophilic planar systems. *Biointerphases* **11**, 19004 (2016).
 124. Kanduč, M., Schlaich, A., Schneck, E. & Netz, R. R. Water-Mediated Interactions between Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. *Langmuir* **32**, 8767–8782 (2016).
 125. Lum, K., Chandler, D. & Weeks, J. D. Hydrophobicity at Small and Large Length Scales. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4570–4577 (1999).
 126. Fernández, A. & Scott, R. Dehydron: a structurally encoded signal for protein interaction. *Biophys. J.* (2003).
 127. Nguyen, C. N., Cruz, A., Gilson, M. K. & Kurtzman, T. Thermodynamics of Water in an Enzyme Active Site: Grid-Based Hydration Analysis of Coagulation Factor Xa. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 2769–2780 (2014).
 128. Nguyen, C., Gilson, M. K. & Young, T. Structure and Thermodynamics of Molecular Hydration via Grid Inhomogeneous Solvation Theory. *arXiv:1108.4876 [q-bio.BM]* (2011).
 129. Ramsey, S. *et al.* Solvation thermodynamic mapping of molecular surfaces in AmberTools: GIST. *J. Comput. Chem.* **37**, 2029–2037 (2016).
 130. Liwei Li, Dmitry Bedrov, A. & Smith, G. D. Water-Induced Interactions between Carbon Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **110**, 10509–10513 (2006).
 131. Anfinsen, C. B. & Scheraga, H. A. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Protein Chem.* **29**, 205–300 (1975).
 132. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB. Available at:

- <https://www.rcsb.org>. (Accessed: 18th October 2017)
133. Qvist, J., Davidovic, M., Hamelberg, D. & Halle, B. A dry ligand-binding cavity in a solvated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6296–301 (2008).
 134. Gregory, R. B. *Protein-solvent interactions*. (M. Dekker, 1995).
 135. Lumry, R. & Eyring, H. Conformation Changes of Proteins. *J. Phys. Chem.* **58**, 110–120 (1954).
 136. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118 (1965).
 137. Koshland, D. E., Némethy, G. & Filmer, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits *. *Biochemistry* **5**, 365–385 (1966).
 138. Cuendet, M. A., Weinstein, H. & LeVine, M. V. The Allosteric Landscape: Quantifying Thermodynamic Couplings in Biomolecular Systems. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 5758–5767 (2016).
 139. Hilser, V. J., Wrabl, J. O. & Motlagh, H. N. Structural and Energetic Basis of Allostery. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 585–609 (2012).
 140. Motlagh, H. N., Wrabl, J. O., Li, J. & Hilser, V. J. The ensemble nature of allostery. *Nature* **508**, 331–339 (2014).
 141. Daniel K., T. and N. P. S. Ins and Outs of Kinase DFG Motifs. *Chem. Biol.* **20**, 745–746 (2013).
 142. Vijayan, R. S. K. *et al.* Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J. Med. Chem.* **58**, 466–79 (2015).
 143. Namboodiri, H. V. *et al.* Analysis of Imatinib and Sorafenib Binding to p38 α Compared with c-Abl and b-Raf Provides Structural Insights for Understanding the Selectivity of Inhibitors Targeting the DFG-Out Form of Protein Kinases. *Biochemistry* **49**, 3611–3618 (2010).
 144. Zhang, Y.-Y., Wu, J.-W. & Wang, Z.-X. Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase 3-mediated Cross-talk between MAPKs ERK2 and p38 α . *J. Biol. Chem.* **286**, 16150–16162 (2011).
 145. Kutach, A. K. *et al.* Crystal Structures of IL-2-inducible T cell Kinase Complexed with Inhibitors: Insights into Rational Drug Design and Activity

- Regulation. *Chem. Biol. Drug Des.* **76**, 154–163 (2010).
146. Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 9–22 (2010).
 147. Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M. & Alessi, D. R. The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.* **20**, 4380–90 (2001).
 148. Biondi, R. M. *et al.* Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J.* **19**, 979–88 (2000).
 149. Engel, M. The PIF Pocket of AGC Kinases: A Target Site for Allosteric Modulators and Protein-Protein Interaction Inhibitors. in *Protein-Protein Interactions in Drug Discovery* 187–223 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013).
 150. Arencibia, J. M., Pastor-Flores, D., Bauer, A. F., Schulze, J. O. & Biondi, R. M. AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 1302–1321 (2013).
 151. Hindie, V. *et al.* Structure and allosteric effects of low-molecular-weight activators on the protein kinase PDK1. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 758–764 (2009).
 152. Fernández, A. *et al.* Rational drug redesign to overcome drug resistance in cancer therapy: imatinib moving target. *Cancer Res.* **67**, 4028–33 (2007).
 153. Fernández, A. *et al.* An anticancer C-Kit kinase inhibitor is reengineered to make it more active and less cardiotoxic. *J. Clin. Invest.* **117**, 4044–4054 (2007).